

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Lenka Helusová**

Nové poznatky v metabolismu auxinu

New insights on auxin metabolism

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Karel Müller, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Praha, 2020



## **Poděkování**

Chtěla bych velice poděkovat svému školiteli Ing. Karlu Müllerovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost při konzultacích a trpělivost při sepisování práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Janu Petráškovi, Ph.D. a Ing. Kláře Hoyerové, Ph.D. za věcné připomínky ohledně skladby bakalářské práce a podnětné rady, které mi velice pomohly.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.6.2020

Podpis

## Abstrakt

Auxin je nejdéle známý fytohormon s mnoha funkcemi. Podílí se na vývoji zárodku, vegetativním i generativním vývoji, reakci rostlin na stres, a též na jejich senescenci a smrti. Aktivita auxinu v rostlinných buňkách a pletivech je často přirovnávána k působení morfogénů, tj. působení látek, jejichž koncentrace vyvolává přesně definovanou odpověď v podobě tvarování pletiv či orgánů. Vedle mezibuněčného a vnitrobuněčného transportu auxinu jsou hlavními určovateli koncentračních gradientů auxinu jeho biosyntéza a metabolismus. Bez ohledu na délku trvání studia auxinu, není komplexita regulace metabolických drah stále dobře poznána. Tato práce si klade za cíl shrnout současné poznatky o metabolismu auxinu v rostlinách, tj. jeho biosyntetické dráhy, konjugaci a oxidaci, a dát je do kontextu se staršími výsledky.

Klíčová slova: kyselina indol-3-octová, auxin, metabolismus auxinu, biosyntéza auxinu, konjugace auxinu, oxidace auxinu, transport auxinu, regulace aktivity auxinu

## Abstract

Auxin is the longest known phytohormone with many functions. It participates in the development of embryo, in vegetative and generative development, plant stress reaction, and also in their senescence and death. Activity of auxin in plant cells and tissues is quite often compared to the effect of morphogens, i.e. the effect of substances, whose concentrations induce a strictly defined response in tissue and organ formation. Apart from intercellular and intracellular auxin transport, the main determinants of auxin concentration gradients are its biosynthesis and metabolism. Regardless of the long-lasting study of auxin, the complexity of metabolic pathway regulation is still not well known. The aim of this thesis is to summarize current knowledge of the metabolism of auxin in plants, i.e. its biosynthetic pathways, conjugation and oxidation, and put them into a context with older results.

Key words: indole-3-acetic acid, auxin, auxin metabolism, auxin biosynthesis, auxin conjugation, auxin oxidation, auxin transport, regulation of auxin activity

# Obsah:

<b>1. Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Co je to auxin .....</b>	<b>2</b>
2.1. <i>Role v rostlinách a mechanismus účinku</i> .....	2
2.1.1. Typy přirozeného auxinu .....	3
2.1.2. Typy syntetických auxinů .....	4
2.2. <i>Transport auxinu</i> .....	4
2.2.1. Přenašeče auxinu z buňky .....	5
2.2.2. Přenašeče auxinu do buňky .....	6
<b>3. Metabolismus auxinu .....</b>	<b>7</b>
3.1. <i>Biosyntéza</i> .....	8
3.1.1. Na tryptofanu závislé dráhy .....	8
3.1.1.1. Kyselina indol-3-pyrrolozová .....	8
3.1.1.2. Indol-3-acetoamid .....	9
3.1.1.3. Indol-3-acetaldoxim .....	10
3.1.1.4. Tryptamin .....	10
3.1.2. Na tryptofanu nezávislá dráha .....	10
3.2. <i>Konjugace</i> .....	11
3.2.1. Esterový typ vazby .....	11
3.2.2. Amidový typ vazby .....	12
3.2.3. Ostatní .....	14
3.3. <i>Oxidační metabolismus</i> .....	15
3.3.1. Oxidace bez dekarboxylace .....	15
3.3.1.1. OxIAA .....	15
3.3.1.2. OxIAA-Glc .....	17
3.3.1.3. OxIAA-AK .....	18
3.3.1.4. 7-OH-OxIAA-Glc .....	18
3.3.1.5. 6-OH-IAA .....	18
3.3.2. Oxidativní dekarboxylace .....	19
<b>4. Závěr .....</b>	<b>22</b>
<b>5. Použitá literatura .....</b>	<b>24</b>

## Seznam použitých zkratek:

1-NAA: 1-naftalenoctová kyselina

1-*O*-IAG: 1-*O*-IAA- $\beta$ -D-glukóza

2,4,5-T: 2,4,5-trichlorofenoxyoctová kyselina

2,4-D: 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina

2OG-Fe (II): 2-oxoglutarát Fe (II)-dependentní oxygenáza

3-MeneOx: 3-methylen-oxindol

3-MeOx: 3-methyl-oxindol

3-OH-MeOx: 3-hydroxymethyloxindol (oxindol-3-karbinol)

4-Cl-IAA: 4-chloroindol-3-octová kyselina

6-OH-IAA-Asp: N-(6-hydroxyindol-3-yl acetyl)-aspartát

6-OH-IAA-Phe: N-(6-hydroxyindol-3-yl acetyl)-fenylalanin

6-OH-IAA-Val: N-(6-hydroxyindol-3-yl acetyl)-valin

7-OH-OxIAA: 7-hydroxy-2-oxindol-3-octová kyselina

7-OH-OxIAA-Glc: 7-*O*- $\beta$ -D-glukosid 7-hydroxy-2-oxindol-3-octové kyseliny

ABC: ATP-binding cassette; transportní protein/y

ABCB: ABC transportéry typu B

AK: aminokyselina/y

Ala: alanin

AMP: adenosin monofosfát

ARRO-1: adventitious root related oxygenase; oxygenáza související s adventivními kořeny

Asp: aspartát

ATP: adenosin trifosfát

AUX1: auxin-resistant1; permeázy transportující auxin

DAO: dioxygenase for auxin oxidation; dioxygenáza katalyzující oxidaci auxinu

DiOxIAA: dioxindol-3-octová kyselina

FMO: flavinová monooxygenáza

GH3: protein/y rodiny Gretchen Hagen3

Glu: glutamát

Gly: glycin

GUS:  $\beta$ -glukuronidáza

IAA<sup>-</sup>: disociovaná forma IAA

IAA: indole-3-acetic acid; indol-3-octová kyselina

iaaH: IAM hydroláza

IAA-H: nedisociovaná forma IAA

iaaM: IAM tryptofan-2-monooxygenáza

IAInos: IAA-*myo*-inozitol

IAld: indol-3-aldehyd

IAM: indol-3-acetoamid

IAN: indol-3-acetonitril

IAOx: indol-3-acetaldoxim

IBA: indole-3-butyric acid; indol-3-máselná kyselina

ICA: indole-3-carboxylic acid; indol-3-karboxylová kyselina

ILR1: IAA-leucine resistant1; aminohydrolázy štěpící konjugáty auxinu s leucinem

ILR1-like/ILL: IAA leucine resistant1-like; rodina aminohydroláz ILR1

IMe: indol-3-methanol

IPyA/IPA: indol-3-pyruvic acid; indol-3-pyrohroznová kyselina

LAX1: like-AUX1; permeázy transportující auxin podobné AUX1



Leu: leucin

OxIAA: 2-oxindol-3-octová kyselina

OxIAA-Asp: N-(2-oxindol-3-acetyl)-aspartát

OxIAA-Glc: 1-*O*-(2-oxindol-3-yl acetyl)- $\beta$ -D-glukóza

PAA: phenylacetic acid; fenyloctová kyselina

Phe: fenylalanin

PILS: PIN-likes; transportní proteiny podobné PIN proteinům

PIN: PIN-FORMED; protein/y transportující auxin

PIN1-like: skupina PIN proteinů s dlouhou hydrofilní smyčkou

PIN5-like: skupina PIN proteinů s krátkou hydrofilní smyčkou

TAA1: tryptophan aminotransferase of arabidopsis1; tryptofanová aminotransferáza

TAM: tryptamin

TAR: TAA1-related; aminotransferáza příbuzná TAA1

TDC: tryptofan dekarboxyláza

Trp: tryptofan

UDP: uridin difosfát

UGT: UDP-glykosyltransferáza

Val: valin

VAS1: reversal of SAV3; aminotransferáza s obráceným fenotypem než SAV3

WT: wild type; divoký typ

YUC: YUCCA proteiny katalyzující přeměnu IPyA



# 1. ÚVOD

---

Na světě najdeme více než 374 000 druhů rostlin, z toho asi 308 000 představují rostliny cévnaté (Christenhusz & Byng, 2016). Tyto údaje shrnují stav před rokem 2016, jejich počet bude jistě vyšší, jelikož na základě matematického modelování existuje mnoho druhů čekajících na objevení (Joppa *et al.*, 2011). Všechny suchozemské rostliny spojuje přisedlý způsob života. Za účelem přežití v nepříznivých podmínkách došlo u rostlin k expanzi mechanismů obranných, růstových, rozmnožovacích, aby se ubránily predátorům, nebo aby obstály v konkurenci sousedních rostlin. Jak docílit potřeb pro přežití a adekvátních reakcí na měnící se prostředí? Za vším hledejme fytohormony.

Abychom mohli vysvětlit a předvídat reakce a způsob života rostlin, musíme lépe porozumět jejich fyziologii, jak rostou, přijímají živiny, reagují na stres, rozmnožují se, jak celkově žijí v ekosystému. Již víme, že za celou řadu projevů rostlin jsou odpovědné fytohormony, působí od embryogeneze až do umírání. Známe devět základních skupin fytohormonů: auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou, kyselinu salicylovou, kyselinu jasmonovou, strigolaktony, ethylen, brassinosteroidy a další látky s růstově regulační funkcí. Tyto molekuly působí na rostlinný organismus buď v synergii nebo antagonisticky (Wani *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2020).

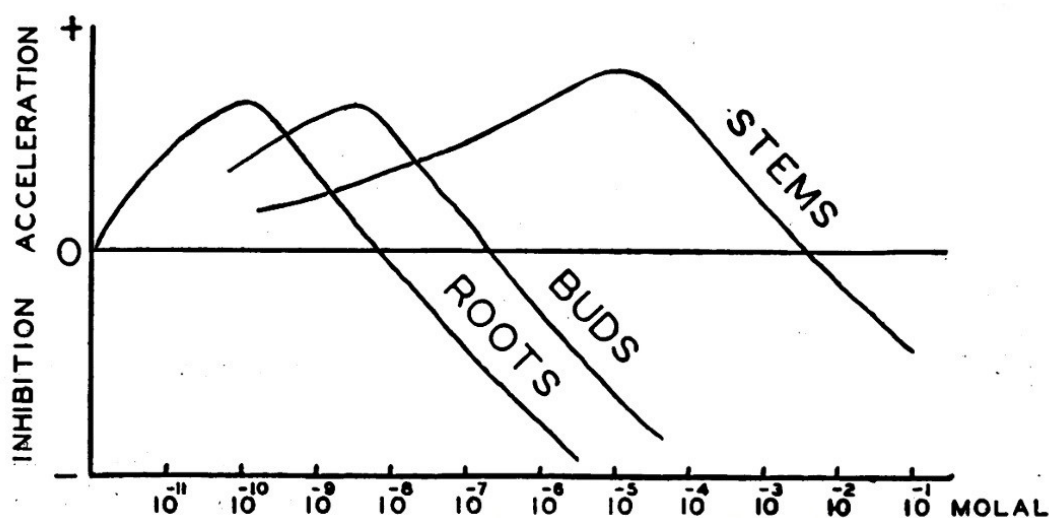
Auxin ve srovnání s ostatními fytohormony zasahuje do zřejmě největšího spektra procesů v rostlinách. Současně s transportem je metabolismus klíčovým dějem v regulaci hladiny auxinu v rostlinném těle. Rychlost a komplexita celého metabolismu souvisí s jeho důležitostí, avšak ztěžují jeho výzkum. Do dnešní doby se nepovedlo objasnit všechny procesy ani identitu všech zapojených metabolitů a genů podílejících se na regulaci procesu. Z toho důvodu bych se chtěla věnovat metabolismu auxinu jako hlavnímu tématu své bakalářské práce. Tento obor je dnes velmi aktuální i díky obrovskému pokroku v technologických možnostech. Mým cílem bylo shrnout současné poznatky o metabolismu auxinu a dát je do kontextu s výsledky nalezenými ve starší literatuře.

## 2. CO JE TO AUXIN

Auxin je fytohormon, často označovaný jako rostlinný morfogen, tj. látka, která navozuje přesně definovanou odpověď v určitém typu buňky, pletivu nebo orgánu v přesně definované koncentraci. První zmínky o auxinu pocházejí již z konce 19. století, kdy se Charles Darwin a jeho syn Francis zabývali mobilním faktorem, který ovlivňuje růst rostlin a ohýbání koleoptilí trav za světlem (Darwin & Darwin, 1880; cit. podle Woodward & Bartel, 2005). V tomto případě ještě látku neidentifikovali. Molekulu auxinu poprvé izoloval Ernst Salkowski z fermentovaného média (Salkowski, 1885; cit. podle Sauer *et al.*, 2013) a identifikována byla jako kyselina indol-3-octová v roce 1934 (Kögl *et al.*, 1934; cit. podle Sauer *et al.*, 2013). Ve vyšších rostlinách byl objeven až v roce 1946 (Haagen-Smit *et al.*, 1946). Od té doby se rozvíjely nové metody a začalo objevování dalších procesů, ve který má auxin významnou úlohu.

### 2.1. ROLE V ROSTLINÁCH A MECHANISMUS ÚČINKU

Auxin se podílí na regulaci mnoha procesů v rostlinném organismu a patří mezi nejdůležitější signální molekuly. Účastní se obecně růstových a vývojových procesů v rostlinách, například elongace buněk v koleoptilích, udržování apikální dominance, regulace embryogeneze a zakládání postranních orgánů, založení polarity embrya, fylotaxe, tropické odpovědi na světlo a gravitaci. Polární transport auxinu také souvisí s utvářením stonku a kořene a diferenciací vodivých pletiv. Odlišné koncentrace auxinu mohou stimulovat nebo inhibovat růst v závislosti na typu orgánu nebo pletiva (Obr.1) (Thimann, 1938).



Obr.1: Přehled koncentrací způsobujících stimulaci nebo inhibici růstu v různých orgánech. (Zdroj obrázku: Thimann, 1938).

### 2.1.1. TYPY PŘIROZENÉHO AUXINU

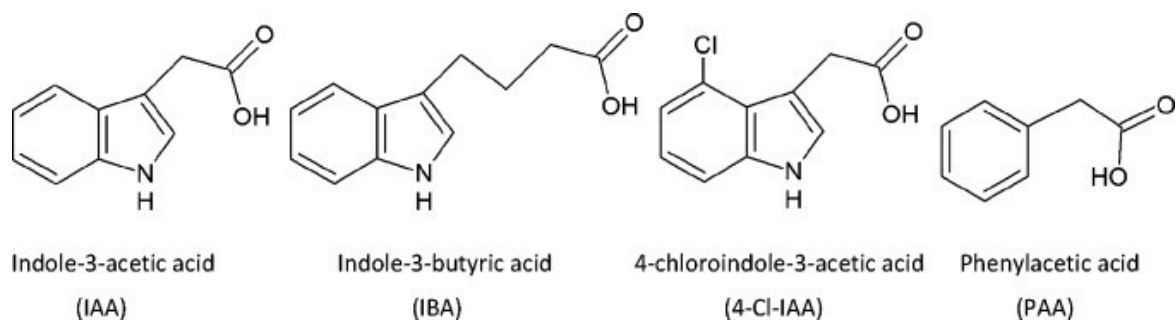
Auxiny jsou látky charakteru slabé karboxylové kyseliny, s planární molekulou a aromatickým jádrem. Mezi auxiny patří kyselina indol-3-octová (IAA), dále se vyskytují kyselina indol-3-máselná (IBA), kyselina 4-chloroindol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA). Jejich chemická struktura je na obrázku 2.

Nejvýznamnějším auxinem je kyselina indol-3-octová, a proto jsem se na ni zaměřila v této bakalářské práci. V následující části bych však chtěla zmínit i ostatní členy z rodiny auxinů.

Prvním z nich je kyselina indol-3-máselná (IBA). Poprvé byla získána z bramborových hlíz (Blommaert, 1954). Známa byla už ve třicátých letech minulého století, ale byla považována za syntetický auxin, který se v rostlinách nevyskytuje (Zimmerman & Wilcoxon, 1935). Postupem času byla nalezena u různých rostlin a v různých orgánech (Ludwig-Müller & Epstein, 1993; Ludwig-Müller *et al.*, 1993; Sauer *et al.*, 2013). IBA v rostlinách způsobuje tvorbu kořenů na listech a stonku, pokud je aplikována přímo na povrch orgánů, dále indukuje epinastii listů, dělení buněk, ohýbání stonku a zrychlení růstu (Zimmerman & Wilcoxon, 1935). IBA je důležitou zásobní formou IAA (Bartel *et al.*, 2001). Metabolismus IBA byl přehledně popsán v článku: Damodaran & Strader, 2019.

Kyselina 4-chloroindol-3-octová (4-Cl-IAA) byla objevena v nedozrálých semenech hrachu setého (Gandar & Nitsch, 1967; cit. podle Sauer *et al.*, 2013; Marumo *et al.*, 1968). Byla též nalezena v borovici lesní (Reinecke, 1999), avšak ne v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. 4-Cl-IAA se uplatňuje při elongaci koleoptile u kukuřice (Hertel, 1993, cit. podle Rescher *et al.*, 1996), stimuluje růst perikarpu v hrášku (Reinecke *et al.*, 1995) a způsobuje expanzi protoplastů (Steffens & Lüthen, 2000; Simon & Petrášek, 2011).

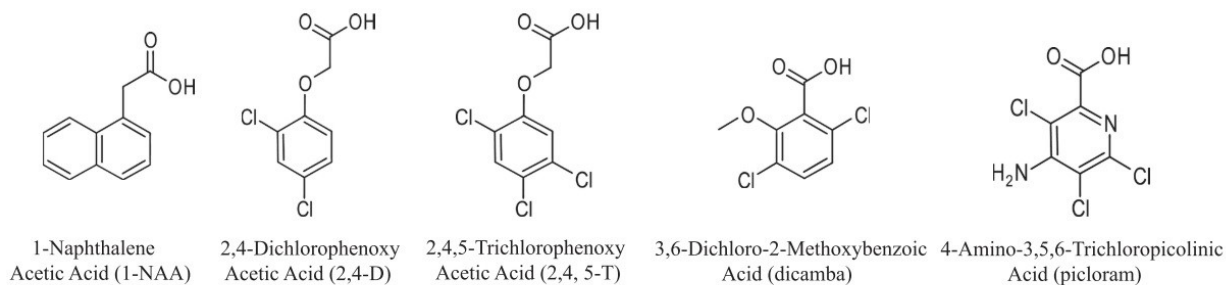
Kyselina fenyloctová (PAA) je jediný fenylový derivát mezi auxiny. PAA byla nalezena v rajčeti, slunečnici, hrachu, tabáku, kukuřici a ječmeni (Wightman & Lighty, 1982). Kromě těchto cévnatých rostlin se PAA vyskytuje i v bezcévných rostlinách, mechu čepence odstálé a jatrovce porostnici mnohotvárné (Sugawara *et al.*, 2015). Indukuje epinastii rajčatových řízků, stimuluje růst kořenů (Zimmerman & Wilcoxon, 1935) a elongaci stonků fazole (Small & Morris, 1990). U některých rostlin, např. u hrachu, převažuje v rychle rostoucích částech rostliny hladina PAA nad IAA (Wightman & Lighty, 1982).



Obr. 2.: Chemická struktura přírodních auxinů (Zdroj: Simon & Petrášek, 2011).

### 2.1.2. TYPY SYNTETICKÝCH AUXINŮ

Syntetické auxiny mají stejné nebo podobné účinky na růst rostlin jako přirozené auxiny, proto jsou také označovány jako „rostlinné růstové regulátory“ (George, 1963; cit. podle Sauer *et al.*, 2013). Mezi syntetické auxiny řadíme například kyselinu 1-naftalenoctovou (1-NAA), kyselinu 2,4-dichlorofenoxyoctovou (2,4-D), kyselinu 2,4,5-trichlorofenoxyoctovou (2,4,5-T), kyselinu 4-amino-3,5,6-trichloropikolinovou (picloram), kyselinu 3,6-dichloro-2-methoxybenzoovou (dicamba) a mnoho dalších. Tyto syntetické auxiny jsou stabilnější než přírodní IAA (Dunlap *et al.*, 1986), a protože auxiny obecně ve vysokých koncentracích inhibují růst, využívají se jako herbicidy (Bentley & Housley, 1953; Grossmann, 2003). Chemickou strukturu najdeme na obrázku 3.



Obr.3.: Chemická struktura syntetických auxinů (Sauer *et al.*, 2013).

## 2.2. TRANSPORT AUXINU

Vzhledem k významu auxinu v regulaci mnoha vývojových procesů rostlin musí být jeho hladina kontrolována na úrovni buněk, pletiv i orgánů, a to buď na úrovni metabolismu (viz kapitola 3.), nebo jeho řízeným transportem. Auxin je transportován na krátkou (mezi buňkami), i dlouhou vzdálenost floémem mezi zdrojem a místem využití (nejčastěji z nadzemních částí do kořene).

Jak již bylo zmíněno, auxin je planární molekula s aromatickým jádrem a karboxylovou skupinou. V důsledku toho může molekula volně difundovat do buněk z apoplastu. Ven z buněk však musí být transportována přenašeči. V apoplastu buněčných stěn je nižší pH (pH=5-5,5), karboxylová skupina auxinu je protonovaná (IAA-H), a molekuly auxinu mohou volně projít do cytosolu. Stejná situace platí pro transport přes membránu vakuoly, kde je též nízké pH (pH=5,5). Avšak v cytosolu najdeme vyšší pH (pH=7), v těchto podmínkách je karboxylová skupina auxinu v disociované formě (IAA<sup>-</sup>), a takto polární molekula již není schopná difuze ven z buňky (Rubery & Sheldrake, 1973). Transportní funkci zastávají více či méně specifické přenašeče (Swarup & Bhosale, 2019).

### 2.2.1. PŘENAŠEČE AUXINU Z BUŇKY

Auxin se do buněk může dostat i prostřednictvím volné difuze, avšak ven z buňky pouze za využití transportérů. Proto mají přenašeče ven z buňky větší význam ve vývojových procesech rostlin než přenašeče do buňky (Friml, 2010).

V rostlinách najdeme nejméně 2 superrodiny proteinů, které se účastní transportu auxinu ven z buněk. Jde o rostlině specifické PIN-FORMED proteiny (PIN) a proteiny z rodiny ATP-binding cassette (ABC). PINy se podílejí na polárním transportu auxinu (Naramoto, 2017). Polární transport je důležitý v řadě procesů vývoje rostliny. Podílí se na vzniku cévních svazků, gravitropismu a fototropismu. Při vývoji embrya vede k ustanovení apikálně-bazální polarity a tím startuje jeho správný vývoj (Petrášek & Friml, 2009).

Ačkoliv auxinové přenašeče ven z buňky, jejich souvislost s polárním transportem a lokalizace na bazální straně buněk byly objeveny již v 80. letech (Jacobs & Gilbert, 1983), první zmínka o PIN proteinech jako zprostředkovatelích transportu se objevuje až v 90. letech 20. století (Roman *et al.*, 1995; Gälweiler *et al.*, 1998). PINy jsou integrační membránové proteiny formovány hydrofilní smyčkou a dvěma sadami hydrofobních transmembránových domén. Dělí se do dvou skupin podle charakteru hydrofilní smyčky na „dlouhé“ PINy (PIN1-like) a „krátké“ PINy (PIN5-like). V rostlině huseníčku patří mezi PIN1-like proteiny PIN1/2/3/4/7, které se nachází převážně na plazmatické membráně buněk (Bennett *et al.*, 2014). Jako PIN5-like proteiny se označují proteiny PIN5/8, které mají smyčku velmi redukovanou, a PIN6 s částečně zkrácenou smyčkou. PIN5-like byly nalezeny na endoplazmatickém retikulu. Tyto potenciální transportéry auxinu se tedy nepodílejí na mezibuněčném transportu, ale využívají se pravděpodobně k regulaci hladiny auxinu uvnitř buňky (Mravec *et al.*, 2009). U různých rostlin může být jiný počet „krátkých“ a „dlouhých“ PINů, např. u bramboru se vyskytuje 10 PINů, u kukuřice 12 PINů (Yang *et al.*, 2019).

Dalším známým transportním komplexem jsou ABC transportéry, zejména typu B, tedy ABCB (ATP-binding cassette subfamily B). Oproti PINům, které se jen výjimečně vyskytují mimo rostlinnou říši (Titapiwatanakun & Murphy, 2009), se ABCB proteiny vyskytují i u jiných organismů, např. u člověka (Becker *et al.*, 2009; cit. podle Zažímalová *et al.*, 2010), kde slouží jako transportéry různých látek přes buněčnou membránu.

V rostlinách můžeme najít také rodinu proteinů PIN-likes (PILS) strukturně podobných proteinům PIN, avšak tyto proteiny se nacházejí na membráně endoplazmatického retikula. Buněčné linie se změnami v expresi PILSů vykazovaly odlišný metabolický profil auxinu. Pravděpodobně se tedy podílejí na regulaci intracelulární koncentrace auxinu (Barbez *et al.*, 2012).

### **2.2.2. PŘENAŠEČE AUXINU DO BUŇKY**

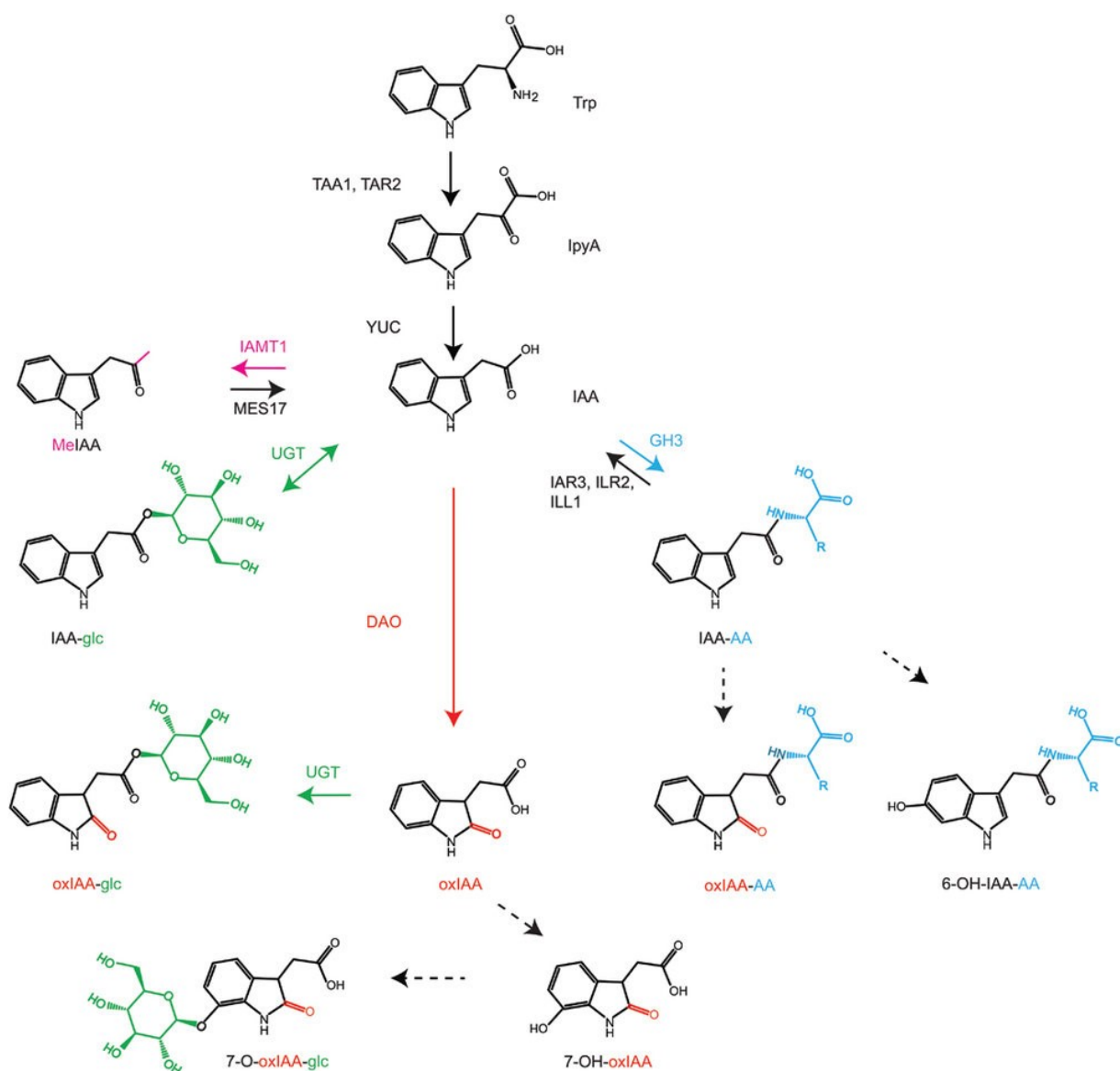
Auxin difunduje do cytosolu volně. Na membránách můžeme však najít i vtokové přenašeče, které podporují transport auxinu do specifických buněčných typů, např. do buněk kolumely. Permeázy z rodiny auxin-resistant1/like-AUX1 (AUX1/LAX) transportují IAA<sup>-</sup> symportem se dvěma protony vodíku přes cytoplazmatickou membránu z apoplastu do cytosolu (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2001).

Auxinový transport je přehledně popsán například v těchto článcích: Sauer & Kleine-Vehn, 2019; Swarup & Bhosale, 2019; Allen & Ptashnyk, 2020.



### 3. METABOLISMUS AUXINU

Hladina auxinu je regulována jeho zdrojem a spotřebou. Zdrojem je myšlena biosyntéza *de novo*, hydrolýza IAA konjugátů, konverze z jiných zásobních sloučenin nebo transport z jiných částí rostliny. Do spotřeby se zahrnuje oxidace, konjugace, transport na jiné místo využití a spotřeba auxinu v procesu růstu (Bandurski *et al.*, 1995). Na obrázku 4 jsou přehledně představeny metabolity, enzymy a poznané či zatím nepoznané dráhy.



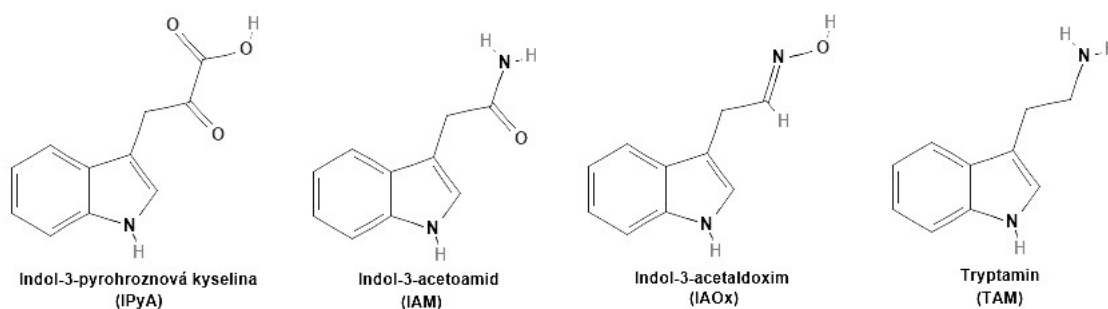
Obr.4: Přehled metabolitů a enzymů zapojených do metabolismu, včetně biosyntézy. Plné šipky představují metabolické dráhy, přerušované šipky znamenají, že dráhy ještě nebyly enzymaticky charakterizovány. Zelené popisky se týkají glukózy, modré aminokyselin, červené oxidace. Enzymy: tryptofanová aminotransferáza (TAA1); tryptofanová aminotransferáza (TAR2); proteiny katalyzující přeměnu IPyA (YUC); UDP-glykosyltransferáza (UGT), dioxygenáza katalyzující oxidaci auxinu (DAO); syntetázy konjugující auxin s aminokyselinami (GH3; Gretchen Hagen3); amidohydrolázy z rodiny ILR1-like (IAR3, ILR2, ILL1). (Zdroj obrázku: Zhang and Peer, 2017).

### 3.1. BIOSYNTÉZA

V modelové rostlině huseníčku byly částečně nebo úplně popsány biosyntetické dráhy závislé a nezávislé na tryptofanu (Trp). V této práci jsem se zaměřila na biosyntézu kyseliny indol-3-octové. Co se týče ostatních přirozených auxinů, biosyntéza IBA závisí na IAA (Damodaran & Strader, 2019), oproti tomu 4-Cl-IAA není na IAA závislá a jejím prekurzorem je 4-Cl-Trp (Reinecke, 1999). U obou drah nejsou zcela jasné odpovědné enzymy ani mechanismus. Biosyntetická dráha PAA také není zcela prozkoumána, ale objevují se návrhy, že v biosyntéze jsou zapojeny proteiny z rodiny YUCCA a TAA (Sugawara *et al.*, 2015).

#### 3.1.1. NA TRYPTOFANU ZÁVISLÉ DRÁHY

Tryptofan závislé dráhy vycházejí z aminokyseliny tryptofanu, jsou více prozkoumané a hrají pravděpodobně majoritní roli v biosyntéze auxinu. Byly navrženy 4 dráhy pojmenované podle prvního metabolitu (Obr.5), který vzniká z L-Trp.



Obr.5.: První metabolity biosyntetických drah vznikající z tryptofanu. Indol-3-pyrroline kyselina (IPyA), indol-3-acetamin (IAM), indol-3-acetaldoxim (IAOx), tryptamin (TAM).

(Zdroje obrázků, upraveno:

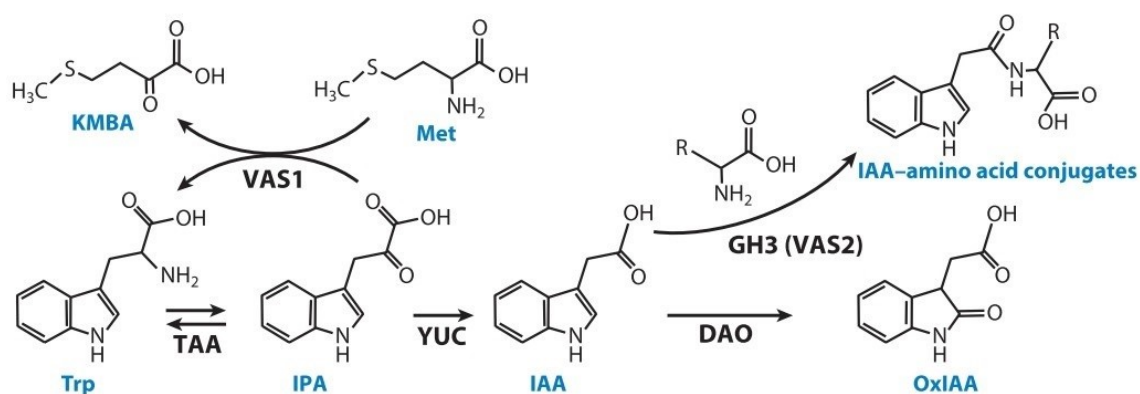
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indole-3-pyruvic-acid#section=2D-Structure>  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/397#section=2D-Structure>  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5371769#section=2D-Structure>  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1150#section=2D-Structure> )

##### 3.1.1.1. Kyselina indol-3-pyrrolineová

Dráha kyseliny indol-3-pyrrolineové (IPyA, IPA) je jediná z těchto drah, která byla kompletně popsána (Obr.6). Tato přeměna tryptofanu na IAA probíhá ve dvou krocích. Nejprve dochází ke konverzi Trp na IPyA působením tryptophan aminotransferase of arabidopsis1 (TAA1) a TAA1-related proteinů (TARs) (Stepanova *et al.*, 2008). Avšak IPyA může být zpětně přeměněna (Obr.6) za účasti dvou komponent: pyridoxalfosfát dependentní aminotransferázy reversal of SAV3 phenotype1 (VAS1), a aminokyseliny methioninu jako

zdroje aminoskupiny (Zheng *et al.*, 2013). TAA1 je kódována geny *wei8* a *sav3*, které byly objeveny analýzou mutantů s kořeny nereagujícími na ethylen (*weak ethylene insensitive8*, *wei8*) a mutantů s nedostatečnou reakcí na stín (*shade avoidance3*, *sav3*) (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; cit. podle Olatunji *et al.*, 2017).

V druhém kroku je IPyA převedena na IAA pomocí YUCCA proteinů (YUC). YUC proteiny jsou flavinové monooxygenázy (FMO) (Zhao *et al.*, 2001). Konverze IPyA na IAA je nevratná reakce. YUCCA enzymy se staly prvními FMO nalezenými v rostlinách. Kromě rostlin se FMO vyskytují i v jiných organismech, například u savců včetně člověka. Rostlinné YUCCA proteiny sdílejí charakteristické struktury a obdobné vlastnosti jako savčí FMO (Cashman, 2002). Tato problematika je detailněji shrnuta například v článku: Cao *et al.*, 2019.



**Obr.6.:** Jediná kompletně popsaná biosyntetická dráha IAA. První krok může být reverzibilní působením VAS1 a methioninu (Met). Na biosyntézu navazuje konjugace pomocí GH3 a oxidace pomocí DAO (viz kapitoly 3.2. a 3.3.). Enzymy: tryptofanová aminotransferáza (TAA1); aminotransferáza katalyzující přeměnu IPyA na Trp (VAS1); proteiny katalyzující přeměnu IPyA (YUC); dioxygenáza katalyzující oxidaci auxinu (DAO); syntetázy konjugující auxin s aminokyselinami (GH3; Gretchen Hagen3). (Zdroj obrázku: Zhao, 2018).

V huseníčku bylo nalezeno 5 TAA a 11 YUC proteinů (Cheng, Dai & Zhao, 2006; cit. podle Chen *et al.*, 2014), v rýži 4 TAA a 14 YUC, v kukuřici 6 TAA a 9 YUC proteinů (Matthes *et al.*, 2019).

### 3.1.1.2. Indol-3-acetoamid

Indol-3-acetoamidová (IAM) dráha je více studována v IAA syntetizujících bakteriích. Jedná se především o bakterie asociované s rostlinami, např. rody *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. Bakteriální dráha se skládá ze dvou kroků, v prvním kroku je Trp konvertován tryptofan-2-monooxygenázou (*iaaM*) na IAM. V druhém vzniká IAA z IAM působením IAM hydrolázy (*iaaH*). U rostlin byl zatím nalezen pouze metabolit IAM a ortolog IAM hydrolázy v podobě amidázy AMI1. I přes znalost kompletních genomů mnoha rostlinných druhů se však nepodařilo odhalit ortologa *iaaH*. Po vyřazení genu *iaaM* se u mutantních rostlin žádné

fenotypové efekty neprojeví. V důsledku těchto pozorování je existence IAM dráhy v rostlinách zpochybněna. IAM může pravděpodobně též vznikat i z IAOx, avšak enzymy a geny, které by je kódovaly, zatím v rostlinách nalezeny nebyly. I proto je mechanismus vedoucí ke tvorbě IAM v rostlinných buňkách stále neznámý (Sugawara *et al.*, 2009; Tsavkelova *et al.*, 2012; Ljung, 2013; Olatunji *et al.*, 2017; Casanova-Sáez & Voß, 2019).

#### **3.1.1.3. Indol-3-acetaldoxim**

Indol-3-acetaldoximová (IAOx) dráha byla nalezena jen v čeledi brukvovité, kam patří i modelová rostlina huseníček. V této dráze vzniká z tryptofanu intermediát IAOx, jenž je kromě na IAA přeměňován i na kamalexin a indolové glukosinoláty typické pro brukvovité rostliny. Jako katalyzátory konverze Trp na IAOx slouží homology cytochromu P450 z rodiny CYP79, CYP79B2 a CYP79B3 (Mikkelsen *et al.*, 2000). Předpokládá se, že v přeměně IAOx na IAA se objevují dva intermediáty, indol-3-acetoamid (IAM) a indol-3-acetonitril (IAN) (Sugawara *et al.*, 2009). Kompletní mechanismus této dráhy nebyl též doposud objasněn (Sugawara *et al.*, 2009; Ljung, 2013; Olatunji *et al.*, 2017; Casanova-Sáez & Voß, 2019).

#### **3.1.1.4. Tryptamin**

V tryptaminové (TAM) dráze je Trp konvertován na TAM tryptofan dekarboxylázou (TDC). TDC geny jsou důležité v syntéze terpenoidních indolových alkaloidů a serotoninu, kde TAM představuje první intermediát. Geny pro syntézu TDC najdeme u celé řady rostlin. Předpokládá se, že TAM je prekurzor IAA v rostlinách, ale tato hypotéza zatím není potvrzená. Tryptaminová dráha byla dříve považována za součást IPyA dráhy, ale toto tvrzení bylo již vyvráceno (Lehmann *et al.*, 2010; Tivendale *et al.*, 2010; Mano & Nemoto, 2012; Ljung, 2013; Olatunji *et al.*, 2017).

### **3.1.2. NA TRYPTOFANU NEZÁVISLÁ DRÁHA**

Tato dráha byla navržena nálezem mutantů deficientních v tryptofan syntáze, kteří stále obsahovali vysokou hladinu IAA a IAA konjugátů. Trp je syntetizován z prekurzorů indolu nebo indol-3-glycerol fosfátu v chloroplastech. Hypotéza existence této metabolické cesty staví na poznatku, že prekurzory mohou volně difundovat do cytosolu, kde se vyskytuje cytosolická indol syntáza. Tento enzym je podobný podjednotce A chloroplastové indol syntázy a může syntetizovat IAA nezávisle na Trp. Tento způsob vzniku auxinu je nejméně prozkoumaný a vzbuzuje řadu pochybností (Nonhebel, 2015; Zhao, 2018). Avšak stále se pracuje na jeho poznání (Zhang *et al.*, 2008; Olatunji *et al.*, 2017; Casanova-Sáez & Voß, 2019).

Biosyntéza IAA je tedy stále velmi nepoznaná oblast auxinového metabolismu. Existuje jediná kompletně popsaná metabolická dráha, a to přes meziproduct kyselinu indol-3-pyrohroznovou. O přítomnosti ostatních drah, které byly většinou navrženy na základě přítomnosti jejich intermediátů, můžeme tedy spíše jen spekulovat. S rozvojem analytických technik a technik genetických manipulací, a s dostupností úplných anotovaných rostlinných genomů lze očekávat i vyjasnění mechanismů vedoucích k syntéze auxinu v rostlinných buňkách.

## 3.2. KONJUGACE

Metabolické profilování auxinu v rostlině huseníčku ukázalo, že jen malá část se vyskytuje ve formě volné IAA. Většinu metabolitů představovaly konjugované formy IAA. Poměry volné IAA a konjugovaných metabolitů se mohou lišit v průběhu vývoje, v různých částech rostliny, a taktéž dle rostlinného druhu (Ludwig-Müller, 2011). IAA se může vázat amidovou nebo esterovou vazbou s různými sloučeninami. Konjugací dojde k inaktivaci volné IAA, a tedy k utlumení auxinového signálu. IAA vázaná s různými substituenty slouží hlavně jako zásobárna IAA. V mnoha případech je konjugace reverzibilní, aktivity specifických hydroláz mohou vést k regeneraci IAA a tím reaktivaci auxinového signálu.

### 3.2.1. ESTEROVÝ TYP VAZBY

Glykosylační reakce hraje důležitou roli při detoxifikaci buněk od xenobiotik, ale také v regulaci aktivity hormonů (shrnutí v Bowles *et al.*, 2006). Byla prokázána glykosylace IAA, cytokininů, brassinosteroidů, kyseliny abscisové, kyseliny salicylové, giberelinů i kyseliny jasmonové (shrnutí v Xu *et al.*, 2002; Soeno *et al.*, 2006; Dean & Delaney, 2008; Meek *et al.*, 2008; Bajguz & Piotrowska, 2009; López-Carbonell *et al.*, 2009; Husar *et al.*, 2011; Ostrowski *et al.*, 2014). IAA je vázána esterovou vazbou s cukry, např. s glukózou, nebo s cyklickými polyoly, např. s inozitem. Tvorbu glykosidů katalyzují enzymy glykosyltransferázy.

Esterové konjugáty IAA s glukózou a inozitem byly prvně izolovány z kukuřice (shrnutí v Cohen & Bandurski, 1982; Michalczyk & Bandurski, 1982). Další experimenty na kukuřici vedly k objevu glykosyltransferázy, která je schopna konjugovat IAA s cukry (Michalczyk & Bandurski, 1980; Szerszen *et al.*, 1994). Gen kódující uridin difosfát (UDP) glykosyltransferázu specifickou pro IAA byl následně objeven i v huseníčku (Jackson *et al.*, 2001).

V prvním kroku reakce vzniká z IAA a UDP-glukózy intermediát 1-O-IAA- $\beta$ -D-glukóza (1-O-IAGlc), reakce je katalyzovaná enzymem ze skupiny UDP-glykosyltransferáz (UGT) 1-O-IAGlc syntázou (Bandurski *et al.*, 1995; Kowalczyk *et al.*, 2002; Ostrowski

*et al.*, 2014). Následuje přeměna 1-*O*-IAGlc spolu s *myo*-inozitem na IAA-*myo*-inozitol (IAInos) za přítomnosti enzymu acyltransferázy (indol-3-acetyl-*myo*-inositol syntáza) (Michalczuk & Bandurski, 1980; Cohen & Bandurski, 1982; Jakubowska & Kowalczyk, 2004; Ciarkowska *et al.*, 2019). IAINos syntáza je pozoruhodný enzym. Kromě syntetické aktivity se zde prokázala zároveň i hydrolytická aktivita, kdy dochází k rozštěpení IAINos na aktivní IAA. K těmto jevům dochází v semenáčcích a semenech kukuřice, odkud pochází většina dosavadních informací, protože semena kukuřice obsahují vysoká množství IAA esterových konjugátů (Kowalczyk *et al.*, 2003; Ciarkowska *et al.*, 2019).

Ve starší literatuře se objevuje zmínka o dalším kroku, kde dochází k vazbě UDP-galaktózy na IAINos za vzniku IAA-*myo*-inozitol-galaktózy (Bandurski & Cohen, 1982). Dnes se již o tomto pokračování neuvažuje (Ostrowski *et al.*, 2020).

Začátkem tohoto roku byla publikována studie, která popisuje mechanismus regulace syntetáz. Autoři předpokládají, že aktivity IAGlc syntetázy a IAINos syntetázy mohou být regulovány na úrovni transkripce i posttranslačně, a že tyto regulace závisí na dostupnosti IAA a na vývojové fázi semene. Autoři se též domnívají, že obě syntetázy svojí funkcí stimulují biosyntézu IAA (Ostrowski *et al.*, 2020).

V rostlině huseníčku existuje glykosyltransferáza UGT84B1, která *in vitro* přednostně glykosyluje IAA. V rostlinách může tento protein metabolizovat IAA i IBA v závislosti na dostupnosti a koncentraci substrátů. Glykosyltransferáza UGT84B1 není jediná v huseníčku, existuje jich daleko více, avšak UGT84B1 vykazuje největší afinitu k IAA (Jackson *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2013). Mechanismus regulace glykosylace nebyl doposud odhalen.

### 3.2.2. AMIDOVÝ TYP VAZBY

Amidový typ vazby najdeme v konjugátech IAA s aminokyselinami nebo s peptidem. Na rozdíl od esterového typu vazby, který převažuje u jednoděložných rostlin, amidový typ tvoří velkou část konjugátů u dvouděložných (Cohen & Bandurski, 1982; Smolko *et al.*, 2018).

Přestože je vazba IAA s aminokyselinami známá již z druhé poloviny minulého století, prvním chemicky analyzovaným amidovým konjugátem auxinu byl až v 80. letech konjugát IAA s aspartátem (Asp) izolovaným ze sóji (Cohen, 1982) a z borovice lesní (Andersson & Sandberg, 1982).

Jen omezené množství aminokyselin je schopné tvořit vazbu s auxinem. Tato konjugace byla doposud prokázána pro tyto aminokyseliny: aspartát (Asp), glutamát (Glu), alanin (Ala),

valin (Val), leucin (Leu), glycin (Gly), tryptofan (Trp), fenylalanin (Phe) s různým procentuálním zastoupením odvíjejícím se od rostlinného druhu (Normanly, 1997; Kowalczyk & Sandberg, 2001; Ludwig-Müller, 2011). Tyto konjugované formy se liší stabilitou vazby a s tím související funkcí v organismu rostlin. V případě konjugace s aminokyselinami Asp a Glu je vazba nevratná. V ostatních případech dochází jen k dočasnému uskladnění, kdy působením hydroláz dochází ke štěpení vazby a uvolnění IAA (Östin *et al.*, 1998; Kowalczyk & Sandberg, 2001). IAA-Trp také nepodléhá štěpení hydrolázami. Slouží jako inhibitor auxinové signalizace, kdy konjugace do IAA-Trp vede ke snížení koncentrace aktivní formy a zároveň inhibuje vliv auxinu při gravitopické odpovědi v kořenech (Staswick, 2009; Ludwig-Müller, 2011).

Konjugáty auxinu s aminokyselinami vznikají působením syntetáz z rodiny Gretchen Hagen3 (GH3). Tyto geny byly objeveny již v 80. letech jako auxin-responsivní, nicméně jejich souvislost s konjugáty byla odhalena až na začátku našeho tisíciletí. GH3 kontrolují hladiny nejen IAA, ale i jasmonové kyseliny (Hagen *et al.*, 1984; Hagen & Guilfoyle, 1985; Staswick *et al.*, 2005). Počet členů GH3 syntetáz se u rostlin liší, např. u huseníčku najdeme 19 proteinů, ve vinné révě 9, v kukuřici 13, v jahodě 8 (Böttcher *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018).

Spojení IAA s aminokyselinami (AK) probíhá ve dvou dílčích reakcích, nejdříve proběhne adenylace acylu na hormonu, a pak transferová reakce. V první etapě se na GH3 váže adenosin trifosfát (ATP), tím dojde k otočení C-terminální domény proteinu do aktivního stavu. Následně se připojí acylová skupina hormonu a hořčnatý iont. Zároveň vzniká místo pro uvolnění pyrofosfátu. Po odštěpení pyrofosfátu rotuje C-terminální doména, zpřístupní tak uzavřené aktivní místo pro navázání aminokyseliny, která svou vazbou vytěsňuje adenosin monofosfát (AMP). Tím vznikne konjugát IAA-AK (Staswick *et al.*, 2005; Gulick, 2009; Okrent *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Westfall *et al.*, 2012, 2016; Vielba, 2019).

Konjugáty s aminokyselinami jsou většinou jen dočasné metabolity IAA. K rozštěpení vazby dochází působením aktivity enzymů amidohydroláz z rodiny IAA-leucine resistant1-like (ILR1-like/ILL) spadající pod rodinu peptidáz M20. Testováním mutantů necitlivých k amidovým konjugátům auxinu se podařilo objevit amidohydrolázu IAA-leucine resistant1 (ILR1) štěpící konjugáty auxinu s leucinem. Aminohydroláza ILR1 kromě IAA-Leu cílí i na IAA-Phe (Bartel & Fink, 1995). Rodina ILR1-like se v huseníčku skládá ze 7 členů: ILR1, ILL1, ILL2, ILL3, IAR3 (ILL4), ILL5 a ILL6. IAR3 a ILL2 jsou nejúčinnější při hydrolýze IAA-Ala, ale ILL2 efektivně štěpí i další konjugáty, např. IAA-Leu, IAA-Phe nebo IAA-Val (Davies *et al.*, 1999; LeClere *et al.*, 2002; Sanchez Carranza *et al.*, 2016). ILL5 je považována

za pseudogen omezený jen na některé ekotypy huseníčku (Davies *et al.*, 1999). Proteiny ILL3 a ILL6 nevykazují amidohydrolázovou aktivitu nebo jen velmi omezenou v podmínkách *in vitro* (LeClere *et al.*, 2002; Sanchez Carranza *et al.*, 2016), ILL1 hydrolyzuje IAA-Ala *in vitro*, ale kinetická analýza naznačuje, že nepřispívá k hydrolýze *in vivo* (LeClere *et al.*, 2002).

Tyto aminohydrolázy se podobají bakteriálním hydrolázám, jako jsou hippurázy nebo aminoacylázy. Některé bakteriální druhy produkují hydrolázy, které patří do rodiny peptidáz M20 (LeClere *et al.*, 2002; Campanella *et al.*, 2003). Předpokládá se, že ILR1-like fungují na podobném principu jako bakteriální hydrolázy z rodiny peptidáz M20 (Bitto *et al.*, 2009). Ve studii Bitto a kol. zkoumali strukturu ILL2. Glu172 je umístěn tak, aby mohl působit jako báze při deprotonaci vody, a tím napomocť nukleofilnímu ataku deprotonované vody na amidový karbonyl konjugátu. Glu172 může také fungovat jako donor protonu pro amidový dusík konjugátu, a tak se lépe odštěpí odstupující skupina (Bitto *et al.*, 2009). V aktivním místě vyžadují amidohydrolázy dva zinečnaté ionty jako redukční činidlo (Smolko *et al.*, 2018).

Jak jsem zmínila výše, konjugáty IAA-Asp a IAA-Glu nelze štěpit, žádné hydrolázy vazbu nedokáží rozrušit a aktivní IAA tak nemůže být z těchto konjugátů regenerována a dále využita (LeClere *et al.*, 2002; Sanchez Carranza *et al.*, 2016).

### 3.2.3. OSTATNÍ

Kromě glukózy a aminokyselin se může IAA vázat například s proteiny nebo peptidy. Největší podíl amidových konjugátů s peptidy se objevuje v semenech fazole, kde jsou hlavním zdrojem auxinu. Po vyklíčení semene dochází k hydrolýze a uvolnění IAA. (Bialek & Cohen, 1986, 1989; Seidel *et al.*, 2006; Ludwig-Müller, 2011). V případě proteinových konjugací dochází nejčastěji k vazbě s proteinem IAP1, jeho hladina stoupá při vývoji semene a při klíčení je rychle degradovaný, což by se předpokládalo u zásobního proteinu. Nicméně IAP1 byl nalezen i v jiných pletivech, proto se vědci domnívají, že má ještě další funkce (Walz *et al.*, 2002).

K čemu vlastně rostliny využívají systém syntézy a hydrolýzy konjugátů? IAA-konjugáty často najdeme v semenech, kořenech nebo apikálních pupenech, v různých koncentracích a v zastoupení různých aminokyselin. Zde figurují jako možnost dočasněho uskladnění auxinu pro pozdější využití v růstu rostliny nebo vývoji semene. Enzymy, které se podílejí na konjugaci a dekonjugaci auxinu, tak ovlivňují signální dráhy fytohormonů, a tím nepřímou figurují v regulaci světelné signalizace, rezistence proti patogenům, reakce na sucho a opět růst a vývoj



semen a celého rostlinného těla (Bandurski & Cohen, 1982; Staswick *et al.*, 2005; Westfall *et al.*, 2012, 2016). Celkově důležitou roli aminokyselinových konjugátů v růstu a vývoji rostlin lze předpokládat z bohaté a na druhu závislé rodiny GH3 syntetáz.

### **3.3. OXIDAČNÍ METABOLISMUS**

Dalším způsobem deaktivace IAA je oxidační katabolismus, kdy dochází k chemické modifikaci indolového jádra nebo postranního řetězce způsobující inaktivaci IAA. Tato modifikace je pouze ireverzibilní. Byly objeveny dvě možné dráhy: 1. oxidace bez dekarboxylace za vzniku OxIAA nebo DiOxIAA; 2. oxidativní dekarboxylace IAA katalyzovaná peroxidázou.

#### **3.3.1. OXIDACE BEZ DEKARBOXYLACE**

V následujících kapitolách se zaměřím na hlavní metabolity oxidačních drah a jejich další možnou přeměnu. Pro lepší orientaci jsou v nadpisech kapitol uvedené zkratky názvů produktů.

##### **3.3.1.1. OxIAA**

Prvním produktem oxidační reakce IAA je kyselina 2-oxindol-3-octová (OxIAA). Alternativně může vznikat i kyselina dioxindol-3-octová (DiOxIAA, 3-hydroxy-2-indolon-3-octová), která je hydroxylována na uhlíku 3. Tyto metabolity se přirozeně vyskytují v pletivech rostlin. OxIAA je biologicky neaktivní, na rozdíl od konjugátů není transportována přenašeči a buňky na její přítomnost nereagují (Reinecke & Bandurski, 1983; Pěničik *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Tato oxidační dráha byla nalezena u různých druhů rostlin, např. v kukuřici (OxIAA) (Reinecke & Bandurski, 1983) nebo v bobu obecném (DiOxIAA) (Tsurumi & Wada, 1980). Většinou se v rostlinách vyskytuje jen jeden z produktů - OxIAA nebo DiOxIAA. Výjimkou je rýže, u které se zatím jako u jediného druhu podařila prokázat přítomnost OxIAA i DiOxIAA, a zároveň i přítomnost 5-hydroxy analogů OxIAA a DiOxIAA (Kinashi *et al.*, 1976). Přítomnost DiOxIAA je v rostlinách potvrzena, avšak dnešní literatura se touto problematikou nezabývá.

Výskyt OxIAA v rostlinách byl znám již od 80. let minulého století, avšak enzym katalyzující reakci byl odhalen až o mnoho let později. V jablku byla objevena oxygenáza adventitious root related oxygenase (ARRO-1), jejíž přesná funkce nebyla zcela jasná (Butler & Gallagher, 1999; Smolka *et al.*, 2009). V rýži byl v roce 2013 nalezen gen *dioxygenase for auxin oxidation (DAO)* kódující dioxygenázu katalyzující oxidaci IAA na OxIAA. O DiOxIAA, která se také nachází v rýži, se zde nezmiňují (Zhao *et al.*, 2013). ARRO-1 je sekvenčně podobná s DAO, díky tomu byla prokázána role ARRO-1 v mechanismech

regulujících homeostázi fytohormonů nebo senzitivitu k fytohormonům, o kterých se dříve jen uvažovalo (Zhang & Peer, 2017; Lakehal *et al.*, 2019). Další 2 homologické geny *AtDAO1* a *AtDAO2* byly nalezeny v huseníčku (Voß *et al.*, 2015; Mellor *et al.*, 2016; Porco *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). DAO se skládá z dioxygenázové domény a 2OG-Fe(II) oxygenázové domény stejně jako všechny známé DAO proteiny patřící do superrodiny 2-oxoglutarát Fe (II)-dependentních (2OG-Fe (II)) oxygenáz (Zhang *et al.*, 2016). Tyto 4 *DAO* geny jsou si velmi sekvenčně podobné, zároveň se však liší od ostatních zástupců 2OG-Fe(II) oxygenáz, a proto jsou řazeny do nové podrodiny. Mezi proteiny podobné DAO patří mnoho důležitých proteinů zapojených například v biosyntéze, syntázy giberelinů v rýži a huseníčku, katabolismu nebo opravách DNA ( Porco *et al.*, 2016; Zhang & Peer, 2017).

DAO je důležitý člen katabolické dráhy auxinu ovlivňující celkově růst a vývoj rostliny. Mutace v genu *DAO* vykazuje určité fenotypové odlišnosti od divokého typu (WT). Původně byla aktivita DAO spojována se samčí fertilitou v rýži, kdy byl gen exprimován až v pozdním vývoji a maturovaných prašnících a semeníku (Zhao *et al.*, 2013). U *dao1-1* mutantu s neaktivní DAO můžeme pozorovat zmenšení délky hlavního kořene, zvýšení počtu laterálních kořenů, prodloužení kořenových vlásků přibližně o 80 %, nárůst větvení stonku, zkrácení šesulí. Celkově má DAO vliv na délku kořene, velikost a tvar listů a květních orgánů (Porco *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). V dalších experimentech autoři použili dvojí značení (transkripční fúzi promotoru *AtDAO1* s reportérovým genem  $\beta$ -glukuronidázy (GUS) a translační fúzi *AtDAO1* se zeleným fluorescenčním proteinem) na modelu kořene. Obě značení prokázala lokalizaci proteinu v celé apikální části kořene i v kořenové čepičce, ve stéle a v epidermálních buňkách v maturované části diferenciační zóny včetně kořenových vlásků. Na těchto místech byly v mutantních rostlinách hladiny auxinu zvýšené o 40 % oproti kontrolním WT. Spojení *AtDAO1* se žlutým fluorescenčním proteinem a pozorování celé rostliny odhalily zvýšenou expresi proteinu v dlaždicových buňkách děložních lístků, v epidermis, a také v pericyklických buňkách sousedících s vyvíjejícím se primordiím postranního kořene, ale ne přímo v primordiu. V postranním kořeni byl signál detekován, až po jeho vyvinutí z hlavního kořene (Zhang *et al.*, 2016). Obě pozorování korespondují s fenotypem mutantu *dao1-1*, který vykazuje prodloužení kořenových vlásků a zvýšení počtu laterálních kořenů při absenci DAO (Mellor *et al.*, 2016; Porco *et al.*, 2016). Další práce ukazuje cytoplazmatickou lokalizaci DAO1 v buňkách (Porco *et al.*, 2016).

Porco a kol. dále zkoumali souvislost genu *DAO* s homeostází auxinu. V tomto experimentu použili mutantu s inaktivním *dao1-1* genem a mutantu *dao1-2D* se zvýšenou expresí ve srovnání

s WT. Autoři kvantifikovali metabolity a prekurzory biosyntézy IAA v sedmidenních semenáčcích. V obou mutantech našli sníženou hladinu prekurzorů IPyA, IAM a IAN oproti WT, zatímco koncentrace volné IAA a prekurzory syntézy Trp zůstaly stejné. V *dao1-1* mutantovi identifikovali snížení hladin OxIAA a OxIAA-Glc, a naopak v *dao1-2D* mutantovi byly tyto úrovně zvýšené. Zároveň v této studii přidávali IAA označenou  $^{13}\text{C}_6$  k oběma mutantům a WT. Mutant *dao1-1* vytvářel IAA-Asp a IAA-Glu místo OxIAA na rozdíl od *dao1-2D* a WT (Porco *et al.*, 2016).

Ve výzkumu Mellora a kol. sledovali komplexnost regulace metabolismu a homeostáze auxinu. I díky matematickému modelování zjistili, že existuje mnoho zpětnovazebných smyček, které řídí expresi AtDAO1 a GH3 enzymů fungujících v různém rozmezí, co se týče koncentrace, času a prostoru. Liší se například v rychlosti exprese genů. Pomalá indukce *AtDAO1* auxinem způsobuje, že při slabé inaktivaci IAA může i nadále setrvávat auxinový signál. Buňka tedy může udržovat vhodnou hladinu IAA. Zatímco *GH3* je indukován pouze při vysokých hladinách IAA, proto musí být rychle exprimován, aby se koncentrace snížila co nejrychleji. Tohoto jevu se využívá například při stresové reakci (Mellor *et al.*, 2016).

Z těchto studií vidíme, že dráhy oxidace a konjugace auxinu spolu úzce souvisí, a to jak na úrovni funkce, tak na úrovni regulace. Výsledným efektem je citlivá regulace hladiny aktivního auxinu v buňkách. V případě ztráty jednoho z mechanismů dochází i přes existenci dalších regulačních prvků k imbalanci koncentrace auxinu a vzniku patřičných mutantních fenotypů. Z výše vypsanych studií vyplývá souvislost aktivit DAO a GH3 proteinů, avšak detailní mechanismus této koordinace se stále přesně neví (Porco *et al.*, 2016).

### 3.3.1.2. OxIAA-Glc

OxIAA může být dále metabolizován. OxIAA se v této reakci váže s glukózou za vzniku 1-*O*-(2-oxoindol-3-yl acetyl)- $\beta$ -D-glukózy (OxIAA-Glc) díky katalýze UDP-glykosyltransferázou (UGT). V rostlinách huseníčku byla objevena UGT74D1 jako enzym zodpovědný za konjugaci OxIAA s glukózou. Již dříve bylo zjištěno, že UGT74D1 katalyzuje přeměnu některých auxinů a indolových sloučenin na jejich příslušné glykosidy *in vitro* s největší afinitou k IBA (Jin *et al.*, 2013). V dalších experimentech bylo zjištěno, že substrátová specifita UGT74D1 je vyšší vzhledem k OxIAA v porovnání s IAA (Tanaka *et al.*, 2014).

V rostlinách huseníčku s vyřazeným genem *ugt74d1* byly dále analyzovány hladiny IAA, OxIAA a OxIAA-Glc. U kontrolních WT rostlin byly zjištěny vyšší hladiny OxIAA-Glc a

OxIAA ve srovnání s IAA. Naproti tomu, mutant *ugt74dl* obsahoval 2,5krát větší koncentraci OxIAA vůči WT, koncentrace IAA byla srovnatelná s WT a OxIAA-Glc se snížila o 85 % oproti WT. Z této analýzy autoři usuzují, že UGT74D1 katalyzuje konjugaci OxIAA s glukózou. Dalším závěrem práce je, že OxIAA-Glc patrně vzniká glykosylací OxIAA, a nikoliv oxidací IAA-Glc (Tanaka *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2013; Porco *et al.*, 2016). Mutant *ugt74dl* nemá téměř žádné výrazné fenotypové odlišnosti, nicméně aktivita enzymu má vliv na růst listů, a deficit v expresi proteinu se projeví jejich zkroucením. UGT74D1 patří dle komplexní fylogenetické studie do skupiny L, kam patří i několik dalších rostlinných glykosyltransferáz, například UGT84B1 zmíněná již v kapitole o esterové vazbě (Jin *et al.*, 2013).

### 3.3.1.3. OxIAA-AK

V semenáčcích huseníčku pěstovaných v tekuté kultuře s přidavkem vysoká dávky IAA byly nalezeny další oxidované produkty N-(2-oxindol-3-acetyl)-aspartát (OxIAA-Asp) a N-(6-hydroxyindol-3-yl acetyl)-aspartát (6-OH-IAA-Asp). Autoři studie usuzují, že tyto metabolity pravděpodobně pocházejí z jiné oxidační dráhy než OxIAA nebo OxIAA-Glc, nedochází tedy ke konjugaci OxIAA s aspartátem. Prekurzorem OxIAA-Asp není OxIAA, ale metabolit vzniká oxidací IAA-Asp. Avšak mechanismus a enzym zodpovědný za katalýzu zatím známy nejsou (Östin *et al.*, 1995, 1998; Kai *et al.*, 2007; Zhang & Peer, 2017). OxIAA-Asp byl také nalezen v perikarpu rajčete (Östin *et al.*, 1995).

### 3.3.1.4. 7-OH-OxIAA-Glc

7-O-β-D-glukosid 7-hydroxy-2-oxindol-3-octové kyseliny (7-OH-OxIAA-Glc) byl nalezen v kořenech, stoncích a především semenech kukuřice, ale pouze po přidání IAA s tritiem vodíku na uhlíku 5 [5-<sup>3</sup>H]-IAA. Předpokládalo se, že 7-OH-OxIAA-Glc vzniká z dráhy:

IAA → OxIAA → 7-OH-OxIAA → 7-OH-OxIAA-Glc.

Ale meziprodukt, kyselina 7-hydroxy-2-oxindol-3-octová (7-OH-OxIAA), nebyl nalezen v rostlinách, proto dráha zůstává opomenuta (Nonhebel & Bandurski, 1984; Nonhebel *et al.*, 1985; Lewer & Bandurski, 1987).

### 3.3.1.5. 6-OH-IAA

Hydroxylací amido sloučenin v huseníčku vznikají N-(6-hydroxyindol-3-yl acetyl)-fenylalanin (6-OH-IAA-Phe) a N-(6-hydroxyindol-3-yl acetyl)-valin (6-OH-IAA-Val). Oba metabolity vznikají hydroxylací IAA-Phe a IAA-Val a jejich význam tkví v inaktivaci IAA. Prekurzory této dráhy IAA-Phe a IAA-Val jsou reverzibilní sloučeniny, avšak mechanismus

hydrolyzy jejich hydroxylovaných produktů zatím není známý. Během porovnání variant OxIAA a 6-OH-IAA příslušných aminokyselin, byly koncentrace oxidovaných forem vyšší než hydroxylovaných. Tento fakt patrně vychází z vyšší náchylnosti aminokyselinových konjugátů IAA k oxidaci na uhlíku 2 indolového kruhu než na uhlíku 6. 6-OH-IAA-Phe i 6-OH-IAA-Val jsou velmi málo stabilní, proto je pravděpodobné, že jsou v rostlinách dále přeměněny. Prozatím nebyly objeveny žádné související geny nebo enzymy katalyzující hydroxylaci, ani nebyla zjištěna jejich funkce v rostlinách kromě inaktivace IAA (Kai *et al.*, 2007; Stepanova & Alonso, 2016; Zhang & Peer, 2017). V roce 1998 byl identifikován produkt OH-IAA-Asp u rýže (Östin *et al.*, 1998), ale v pozdějších pracích byla jeho přítomnost negována (Kai *et al.*, 2007).

Ze článků lze vyvodit, že volná IAA se vyskytuje v rostlinách jen v omezeném množství a většina je dále zpracovávána. Tabulka (Tab.1) ukazuje aktuální data o hladinách volné, konjugované a oxidované IAA v rostlinách huseníčku. Vidíme, že jednotlivé experimenty se liší jak v naměřených koncentracích, tak v identitě detekovaných metabolitů. Některé metabolity, například OxIAA-Asp, nebyly detekovány ani v jedné z recentních publikací.

Metabolit	IAA	IAA-Asp	IAA-Glu	IAA-Glc	OxIAA	OxIAA-Glc	Zdroj
<b>Koncentrace (pg/mg)</b>	19	3	2,9	600	100	11000	(Porco <i>et al.</i> , 2016)
	16	0	0	x	90	x	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
	19	x	x	x	60	1100	(Tanaka <i>et al.</i> , 2014)
	40	0	0	1600	200	4000	(Mellor <i>et al.</i> , 2016)

Tab.1: Porovnání koncentrace metabolitů v *Arabidopsis thaliana* u různých článků. X – ve článku se metabolitem nezabývali.

Zde končí poznatky, které jsem našla o degradaci auxinu přes oxidační dráhu. Zatím není známo, co se děje například s OxIAA, jakým způsobem je regulovaná exprese a posttranslační aktivita IAA oxidáz nebo jestli OxIAA zasahuje do metabolismu jiných hormonů (Zhang & Peer, 2017). Uvažuje se také o způsobu, jak ireverzibilní konjugáty OxIAA, IAA-Asp a IAA-Glu ovlivňují biosyntézu IAA a IPyA (Stepanova & Alonso, 2016).

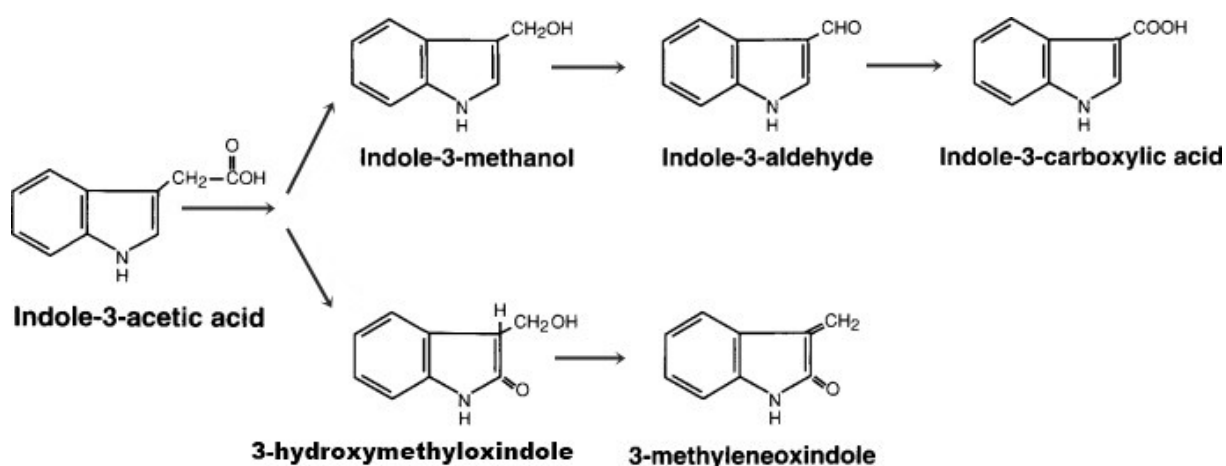
### 3.3.2. OXIDATIVNÍ DEKARBOXYLACE

Na rozdíl od oxidace, oxidativní dekarboxylace zahrnuje většinou modifikaci indolového kruhu a současně postranního řetězce. Produkty této reakce jsou indol-3-aldehyd (IAld), indol-3-methanol (IMe), kyselina indol-3-karboxylová (ICA), 3-hydroxymethyloxindol (3-OH-MeOx) a 3-methylen-oxindol (3-MeneOx). Za přeměnu jsou odpovědné enzymy z rodiny

peroxidáz. Dříve byly tyto tři pojmy „IAA oxidáza“ a „peroxidativní oxidace“ IAA a dekarboxylace považovány za synonyma, ale nesrovnalost v označení se vyjasnila po objevení a lepším poznání nedekarboxylační oxidační dráhy. V minulosti se vědci domnívali, že OxIAA může být meziproduktem oxidativní dekarboxylace. Tato myšlenka byla později vyvrácena experimentem, ve kterém OxIAA izolovaný z houby *Hygrophorus conicus*, podrobili působení peroxidázy. Jelikož nevznikl žádný produkt, autoři konstatovali, že OxIAA nemůže být intermediátem v oxidační reakci (Siehr, 1961; Hinman & Lang, 1965; Bandurski *et al.*, 1995).

Jako kofaktory reakce mohou sloužit sloučeniny fenolů nebo hořčnaté ionty (BeMiller & Colilla, 1972). U fenolů lze pozorovat inhibiční i aktivační účinek. Monofenoly a *m*-disubstituované fenoly stimulují oxidaci, zatímco disubstituované *p*- a *o*-fenoly, kumariny a polyfenoly zpomalují nebo inhibují reakci. Avšak reakce probíhá i bez kofaktorů pouze katalyzována aktivitou peroxidáz (Grambow & Langenbeck-Schwich, 1983; Sabater *et al.*, 1983; Bandurski *et al.*, 1995).

Existují dvě popsané dráhy (Obr.7), které produkují různé metabolity – indoly a oxindoly. Obě tyto dráhy se oddělují až po dekarboxylaci IAA, kdy se předpokládá, že za působení peroxidázy se vytvoří epoxid. Reakce dále pokračují dle různé konverze epoxidu (Hinman & Lang, 1965; Bandurski *et al.*, 1995).



Obr.7: Dvě možnosti oxidativní dekarboxylace, nahoře je indol-3-methanolová dráha, kde vzniká jako konečný produkt indol-3-aldehyd, který může být převeden na kyselinu indol-3-karboxylovou. Dole je 3-methylenoxindolová dráha produkující 3-hydroxymethyloxindol, z něhož neenzymaticky vzniká 3-methylenoxindol. (Zdroj obrázku, upraveno: Srivastava, 2002).

V indolové dráze (Obr.7) vzniká jako první metabolit indol-3-methanol (IMe) otevřením epoxidového kruhu. IMe je dále oxidován peroxidázou na indol-3-aldehyd (IAI). V reakci je většinou zapojen molekulární kyslík a ne kyslík pocházející z vody (Abrahamovitch & Ahmed,

1961; Hinman & Lang, 1965; Grambow & Langenbeck-Schwich, 1983; Bandurski *et al.*, 1995). IAl může být dále oxidován na kyselinu indol-3-karboxylovou (Libbert *et al.*, 1970).

3-methylenoxindolová dráha (Obr.7) produkuje jako první intermediát 3-hydroxymethyloxindol (3-OH-MeOx) reakcí epoxidu s vodou. Dehydratací 3-OH-MeOx bez přítomnosti enzymu vzniká 3-methylenoxindol (Hinman & Lang, 1965; Bandurski *et al.*, 1995). Na rozdíl od IMe, kde je zdrojem kyslíku molekula O<sub>2</sub>, atom kyslíku v 3-OH-MeOx pochází z vody (Reinecke & Bandurski, 1987).

Peroxidázou katalyzované reakce v rostlinách jsou specifické v tom, že se většinou spotřebovává kyslík a není vyžadován externí přísun peroxidu vodíku (Mason, 1957; Hinman & Lang, 1965; Ljung *et al.*, 2002). Nicméně procesy v rostlinách jsou variabilní, proto i zde můžeme najít výjimku v podobě peroxidázy z rajčete, která ke své funkci peroxid vodíku naopak potřebuje (Kokkinakis & Brooks, 1979). Peroxidáza byla poprvé izolována z křene (Ray, 1956). Tento zdroj se stal využívaný v mnoha dalších výzkumech, avšak peroxidázy oxidující IAA byly nalezeny i u dalších druhů rostlin. U modelové rostliny huseníčku však dekarboxylační dráha identifikována nebyla (Schneider & Wightman, 1974; Ljung *et al.*, 2002).

Vzhledem k velmi nízké hladině metabolitů oxidativní dekarboxylace v rostlinách se předpokládá, že tato dráha není hlavní oxidační drahou (Ljung *et al.*, 2002). Poměr výsledných produktů se mění v závislosti na poměru enzym:substrát, pH a kofaktorech. Pokud v reakci chybí některé kofaktory, např. 2,4-dichlorfenol, a je vysoký poměr peroxidáza:substrát, vzniká více IMe a IAld oproti 3-MeneOx, 3-MeOx a 3-OH-MeOx (Sembdner *et al.*, 1980; Bandurski *et al.*, 1995).

V dnešní době už se velký význam dekarboxylativní oxidaci nepřikládá, i když některé výzkumy, například i výsledky naší laboratoře (Dobrev *et al.*, rukopis v přípravě), naznačují, že by jejich úloha v metabolismu auxinu mohla mít větší význam, než se aktuálně usuzuje (Ljung *et al.*, 2002).

## 4. ZÁVĚR

---

Auxin je pro rostliny esenciální signální molekula a plní funkci v regulaci řady procesů. Hladina auxinu musí být velmi precizně regulována. Identifikací a měřením koncentrace auxinu a jeho metabolitů se vědci zabývají již celá desetiletí. Komplexita metabolismu auxinu je však patrná z předchozího textu, a tak je stále mnoho nezodpovězených otázek. Bylo předpokládáno několik potenciálních biosyntetických drah pro biosyntézu a deaktivaci vratnou i nevratnou. V této práci jsem se zaměřila převážně na nejdůležitější auxin, kyselinu indol-3-octovou. Musíme si však uvědomit, že je to jeden zástupce z molekul vykazujících auxinovou aktivitu. V rostlinách najdeme další typy, a každý z nich může mít vlastní způsoby konjugace, možná i transportu, degradace, anebo i další způsoby využití, které ještě neznáme. Všechna témata jsem zmínila jen velmi povrchem, existuje dále velké množství zajímavé literatury, které popisuje další auxinové aktivity. Řada prací pochází ze starší doby, kdy nebyla k dispozici genetická informace modelových rostlin, ani neexistovaly dostatečně citlivé přístroje, a nelze vyloučit diskrepance v závěrech. Nedostatek citlivých metod neumožnil získání některých produktů. Proto až s vyspělejší technikou a modernějšími metodami můžeme pokračovat ve výzkumu. Naopak některé dřívější přístupy mohly vést k identifikaci metabolitů, které pozbyly na významu a dnes je opětovně poznáváme. Prvotřídní technické možnosti dnešní doby nabízí velký potenciál k výzkumu této tematiky. Avšak i moderní přístupy často vyžadují znalost charakteru metabolitu, který hledáme, nebo reakce, která k určitému metabolitu vede. Jen málo metabolických procesů v rostlinách je plně charakterizovaných. Často byly objeveny meziprodukty, konečné produkty nebo účastníci se geny, ale mechanismus nebo přesný průběh celého procesu známy nejsou.

Je těžké určit, který z těchto procesů hraje nejdůležitější roli v regulaci hladiny auxinu. V každé studii najdeme přesvědčivé důkazy, že jejich předmět zájmu je nejdůležitější a proč. Proto se domnívám, že všechny procesy jsou pro rostlinu důležité, ale jejich vzájemná zastupitelnost vede k tomu, že narušením určité dráhy v mutantovi si rostlina většinou pomůže alternativní dráhou, případně jiným členem genové rodiny, a dochází tak jen k dílčím efektům a defektům. V rostlinách se IAA vyskytuje hlavně ve formě vázané v konjugátech nebo ve formě oxidované. Rostlina tím reguluje hladinu auxinu v buňkách. Například konjugace IAA má důležitou funkci při vysoké hladině IAA, oxidace pravděpodobně naopak při nižších koncentracích auxinu (Östin *et al.*, 1998; Mellor *et al.*, 2016). V případě přebytku aktivní formy auxinu, konjugace rapidně sníží jeho dostupnost, a rychleji tak ustanoví vhodnou hladinu hormonu. Oxidací dochází k pomalé inaktivaci, buňka tedy neustále utiňuje auxinový signál,



i v případě, že je koncentrace nízká. Auxinový signál může tímto mechanismem působit i přes kolísání úrovně hormonu.

Měli bychom si uvědomit, že většina známých poznatků o auxinu a jeho metabolismu pochází z huseníčku, kukuřice, rýže, tabáku a některé poznatky i z jiných rostlin, ale rostlinná říše je obrovská, a každý druh může mít vlastní dráhy nebo způsoby regulace. Příklad jsme mohli vidět u zástupců z čeledi brukvovitých. Zde se vyskytuje jedinečná dráha biosyntézy auxinu z IAOx, která souvisí s metabolity typickými pro tuto čeleď a u jiných druhů se zatím nenašla.

Během zpracování bakalářské práce mi přišlo fascinující, jak je možné, že jedna malá molekula dokáže ovládat tolik dějů, a čím vším se jeho aktivita reguluje. Právě z těchto důvodů je úžasné zkoumat auxin a jeho metabolismus, stále je co objevovat. Některé články nastínily možné řešení určitých cest nebo předvídaly identifikaci možných enzymů. Výzkum metabolismu auxinu má před sebou další výzvy, které do budoucna potrápí vědeckou komunitu.

## 5. POUŽITÁ LITERATURA

---

- Abrahamovitch, R. A. & Ahmed, K. S. (1961) 'Oxidative decarboxylation of indole-3-acetic acid by mangani-versene and by wheat leaf enzyme', *Nature*, 192, pp. 259–260.
- Allen, H. R. & Ptashnyk, M. (2020) 'Mathematical modelling of auxin transport in plant tissues: flux meets signalling and growth', *Bulletin of Mathematical Biology*, 82(2).
- Andersson, B. & Sandberg, G. (1982) 'Identification of endogenous n-(3-indoleacetyl) aspartic acid in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by combined gas chromatography-mass spectrometry, using high-performance liquid chromatography for quantification', *Journal of Chromatography A*, 238(1), pp. 151–156.
- \*Bajguz, A. & Piotrowska, A. (2009) 'Conjugates of auxin and cytokinin', *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 70(8), pp. 957–969.
- Bandurski, R. S. & Cohen, J. D. (1982) 'Chemistry and physiology of the bound auxin', *Annual Review of Plant Physiology*, 1(16), pp. 550–550.
- Bandurski, R. S., Cohen, J. D., Slovin, J. P. & Reinecke, D. M. (1995) 'Auxin biosynthesis and metabolism', in Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones*. Springer, Dodrecht, pp. 39–65.
- Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Béziat, C., Pěňčík, A., Wang, B., Rosquete, M. R., Zhu, J., Dobrev, P. I., Lee, Y., Zažímalová, E., Petrášek, J., Geisler, M., Friml, J. & Kleine-Vehn, J. (2012) 'A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants', *Nature*, 485(7396), pp. 119–122.
- Bartel, B. & Fink, G. R. (1995) 'ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates', *Science*, 268(5218), pp. 1745–1748.
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M. & Zolman, B. K. (2001) 'Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation', *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(3), pp. 198–216.
- \*Becker, J. P., Depret, G., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M. & Prévost, M. (2009) 'Molecular models of human p-glycoprotein in two different catalytic states', *BMC Structural Biology*, 9.
- BeMiller, J. N. & Colilla, W. (1972) 'Mechanism of corn indole-3-acetic acid oxidase in vitro', *Phytochemistry*, 11(12), pp. 3393–3402.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. & Feldmann, K. A. (1996) 'Arabidopsis AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism', *Science*, 273(5277), pp. 948–950.
- Bennett, T., Brockington, S. F., Rothfels, C., Graham, S. W., Stevenson, D., Kutchan, T., Rolf, M., Thomas, P., Wong, G. K. S., Leyser, O., Glover, B. J. & Harrison, C. J. (2014) 'Paralogous radiations of PIN proteins with multiple origins of noncanonical PIN structure', *Molecular Biology and Evolution*, 31(8), pp. 2042–2060.
- Bentley, J. A. & Housley, S. (1953) 'Growth of avena coleoptile sections in solutions of 3-indolylacetic acid and 3-indolylacetoneitrile', *Physiologia Plantarum*, 6(3), pp. 480–484.
- Bialek, K. & Cohen, J. D. (1986) 'Isolation and partial characterization of the major amidelinked conjugate of indole-3-acetic acid from *Phaseolus vulgaris* L.1', *Plant Physiology*, 80(1), pp. 99–104.

- Bialek, K. & Cohen, J. D. (1989) 'Free and conjugated indole-3-acetic acid in developing bean seeds', *Plant Physiology*, 91(2), pp. 775–779.
- Bitto, E., Bingman, C. A., Bittova, L., Houston, N. L., Boston, R. S., Fox, B. G. & Phillips, G. N. (2009) 'X-ray structure of ILL, an auxin-conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 74(1), pp. 61–71.
- Blommaert, K. L. J. (1954) 'Growth- and inhibiting-substances in relation to the rest period of the potato tuber', *Nature*, 174(4438), pp. 970–972.
- Böttcher, C., Boss, P. K. & Davies, C. (2011) 'Acyl substrate preferences of an iaa-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development', *Journal of Experimental Botany*, 62(12), pp. 4267–4280.
- \*Bowles, D., Lim, E.-K., Poppenberger, B. & Vaistij, F. E. (2006) 'Glycosyltransferases of lipophilic small molecules', *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), pp. 567–597.
- Butler, E. D. & Gallagher, T. F. (1999) 'Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple (*Malus domestica* 'Jork 9') stem discs', *Journal of Experimental Botany*, 50(333), pp. 551–552.
- Campanella, J. J., Larko, D. & Smalley, J. (2003) 'A molecular phylogenomic analysis of the ILRI-like family of IAA amidohydrolase genes', *Comparative and Functional Genomics*, 4(6), pp. 584–600.
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L. & Cheng, J. (2019) 'The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants', *International Journal of Molecular Sciences*.
- Casanova-Sáez, R. & Voß, U. (2019) 'Auxin metabolism controls developmental decisions in land plants', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 24(8), pp. 741–754.
- Cashman, J. R. (2002) 'Human and plant flavin-containing monooxygenase n-oxygenation of amines: Detoxication vs. bioactivation', *Drug Metabolism Reviews*, 34(3), pp. 513–521.
- Chen, Q., Westfall, C. S., Hicks, L. M., Wang, S. & Jez, J. M. (2010) 'Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase', *Journal of Biological Chemistry*, 285(39), pp. 29780–29786.
- Chen, Q., Dai, X., De-Paoli, H., Cheng, Y., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y. & Zhao, Y. (2014) 'Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots', *Plant and Cell Physiology*, 55(6), pp. 1072–1079.
- \*Cheng, Y., Dai, X. & Zhao, Y. (2006) 'Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*', *Genes and Development*, 20(13), pp. 1790–1799.
- Christenhusz, M. J. M. & Byng, J. W. (2016) 'The number of known plants species in the world and its annual increase', *Phytotaxa*, 261(3), pp. 201–217.
- Ciarkowska, A., Ostrowski, M., Starzyńska, E. & Jakubowska, A. (2019) 'Plant SCPL acyltransferases: multiplicity of enzymes with various functions in secondary metabolism', *Phytochemistry Reviews*, 18(1), pp. 303–316.
- Cohen, J. D. (1982) 'Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-aspartate from seeds of *Glycine max* L.', *Plant Physiology*, 70(3), pp. 749–753.

- Cohen, J. D. & Bandurski, R. S. (1982) 'Chemistry and physiology of the bound auxins', *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), pp. 403–430.
- Damodaran, S. & Strader, L. C. (2019) 'Indole 3-butyric acid metabolism and transport in *Arabidopsis thaliana*', *Frontiers in Plant Science*, 10, pp. 1–9.
- \*Darwin, C. & Darwin, F. (1880) 'The power of movement in plants', in *The Power of Movement in Plants*.
- Davies, R. T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N. & Bartel, B. (1999) 'IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 11(3), pp. 365–376.
- \*Dean, J. V. & Delaney, S. P. (2008) 'Metabolism of salicylic acid in wild-type, ugt74f1 and ugt74f2 glucosyltransferase mutants of *Arabidopsis thaliana*', *Physiologia Plantarum*, 132(4), pp. 417–425.
- Dunlap, J. R., Kresovich, S. & McGee, R. E. (1986) 'The effect of salt concentration on auxin stability in culture media', *Plant Physiology*, 81(3), pp. 934–936.
- Friml, J. (2010) 'Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport', *European Journal of Cell Biology*, 89(2–3), pp. 231–235.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A. & Palme, K. (1998) 'Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue', *Science*, 282(5397), pp. 2226–2230.
- \*Gandar, J. C. & Nitsch, C. (1967) 'The isolation of the methylester of chloro-3-indolyl acetic acid from immature *Pisum sativum* L.', *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 2, pp. 1795–1798.
- \*George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J. (1963) 'Plant propagation by tissue culture', in George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J. (ed) *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edn. Springer, Dodrecht, pp. 115–173.
- Grambow, H. J. & Langenbeck-Schwich, B. (1983) 'The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro', *Planta*, 157(2), pp. 132–137.
- Grossmann, K. (2003) 'Mediation of herbicide effects by hormone interactions', *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(1), pp. 109–122.
- Gulick, A. M. (2009) 'Conformational dynamics in the acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase', *ACS Chemical Biology*, 4(10), pp. 811–827.
- Haagen-Smit, A. J., Dandliker, W. B., Wittwer, S. H. & Murneek, A. E. (1946) 'Isolation of 3-indoleacetic acid from immature corn kernels', *American Journal of Botany*, 33(2), pp. 118–120.
- Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1985) 'Rapid induction of selective transcription by auxins.', *Molecular and Cellular Biology*, 5(6), pp. 1197–1203.
- Hagen, G., Kleinschmidt, A. & Guilfoyle, T. (1984) 'Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections', *Planta*, 162(2), pp. 147–153.

\*Hertel, R. (1993) 'A critical view on proposed hormone action: The example of auxin', in: Smith JC (ed) *Biochemical Mechanisms in Plant Growth Regulation*. Clarendon Press, pp. 1-15.

Hinman, R. L. & Lang, J. (1965) 'Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid', *Biochemistry*, 4(1), pp. 144–158.

\*Husar, S., Berthiller, F., Fujioka, S., Rozhon, W., Khan, M., Kalaivanan, F., Elias, L., Higgins, G. S., Li, Y., Schuhmacher, R., Krska, R., Seto, H., Vaistij, F. E., Bowles, D. & Poppenberger, B. (2011) 'Overexpression of the UGT73C6 alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*', *BMC Plant Biology*, 11.

Jackson, R. G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hogget, J., Ashford, D. A. & Bowles, D. J. (2001) 'Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), pp. 4350–4356.

Jacobs, M. & Gilbert, S. F. (1983) 'Basal localization of the presumptive auxin transport carrier in pea stem cells', *Science*, 220(4603), pp. 1297–1300.

Jakubowska, A. & Kowalczyk, S. (2004) 'The auxin conjugate 1-O-indole-3-acetyl- $\beta$ -D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds', *Journal of Experimental Botany*, 55(398), pp. 791–801.

Jin, S. H., Ma, X. M., Han, P., Wang, B., Sun, Y. G., Zhang, G. Z., Li, Y. J. & Hou, B. K. (2013) 'UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*', *PLoS ONE*, 8(4), pp. 1–11.

Joppa, L. N., Roberts, D. L. & Pimm, S. L. (2011) 'How many species of flowering plants are there?', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1705), pp. 554–559.

Kai, K., Horita, J., Wakasa, K. & Miyagawa, H. (2007) 'Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*', *Phytochemistry*, 68(12), pp. 1651–1663.

\*Khan, N., Bano, A., Ali, S. & Babar, M. A. (2020) 'Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses', *Plant Growth Regulation*. Springer Netherlands, 90(2), pp. 189–203.

Kinashi, H., Suzuki, Y., Takeuchi, S. & Kawarada, A. (1976) 'Possible metabolic intermediates from IAA to  $\beta$ -acid in rice bran', *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(12), pp. 2465–2470.

\*Kögl, F., Erxleben, H. & Haagen-Smit, A.J. (1934) 'About isolation of auxin a and b from plant materials, IX. Notification', *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 243, pp. 209–226.

Kokkinakis, D. M. & Brooks, J. L. (1979) 'Hydrogen peroxide-mediated oxidation of indole-3-acetic acid by tomato peroxidase and molecular oxygen', *Plant Physiology*, 64(2), pp. 220–223.

Kowalczyk, M. & Sandberg, G. (2001) 'Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*', *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 127(4), pp. 1845–1853.

Kowalczyk, S., Jakubowska, A., Zielińska, E. & Bandurski, R. S. (2003) 'Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myoinositol in

- immature endosperm of *Zea mays*', *Physiologia Plantarum*, 119(2), pp. 165–174.
- Kowalczyk, S., Jakubowska, A. & Bandurski, R. S. (2002) '1-Naphtalene acetic acid induces indole-3-ylacetylglucose synthase in *Zea mays* seedling tissue', *Plant Growth Regulation*, 38(2), pp. 127–134.
- Lakehal, A., Dob, A., Novák, O. & Bellini, C. (2019) 'A DAO1-mediated circuit controls auxin and jasmonate crosstalk robustness during adventitious root initiation in *Arabidopsis*', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), pp. 1–15.
- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. T. & Bartel, B. (2002) 'Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), pp. 20446–20452.
- Lehmann, T., Hoffmann, M., Hentrich, M. & Pollmann, S. (2010) 'Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: A widely distributed way of indole-3-acetic acid production?', *European Journal of Cell Biology*, 89(12), pp. 895–905.
- Lewer, P. & Bandurski, R. S. (1987) 'Occurrence and metabolism of 7-hydroxy-2-indolinone-3-acetic acid in *Zea mays*', *Phytochemistry*, 26(5), pp. 1247–1250.
- Libbert, E., Drawert, A., Schröder, R. & Fischer, E. (1970) 'Pathways of IAA production from tryptophan by plants and by their epiphytic bacteria: A comparison', *Physiologia Plantarum*, 22(6), pp. 1217–1225.
- Ljung, K. (2013) 'Auxin metabolism and homeostasis during plant development', *Development*, 140(5), pp. 943–950.
- Ljung, K., Hull, A. K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J. D. & Sandberg, G. (2002) 'Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Molecular Biology*, 50(2), pp. 309–332.
- \*López-Carbonell, M., Gabasa, M. & Jáuregui, O. (2009) 'Enhanced determination of abscisic acid (ABA) and abscisic acid glucose ester (ABA-GE) in *Cistus albidus* plants by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem mode', *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(4), pp. 256–261.
- Ludwig-Müller, J. (2011) 'Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants', *Journal of Experimental Botany*, 62(6), pp. 1757–1773.
- Ludwig-Müller, J. & Epstein, E. (1993) 'Analysis of indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*', *Acta Horticulturae*, 329(19).
- Ludwig-Müller, J., Sass, S., Sutter, E. G., Wodner, M. & Epstein, E. (1993) 'Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana* - I. Identification and quantification', *Plant Growth Regulation*, 13(2), pp. 179–187.
- Mano, Y. & Nemoto, K. (2012) 'The pathway of auxin biosynthesis in plants', *Journal of Experimental Botany*, 63(8), pp. 2853–2872.
- Marumo, S., Hattori, H., Abe, H. & Munakata, K. (1968) 'Isolation of 4-chloroindolyl-3-acetic acid from immature seeds of *Pisum sativum*', *Nature*, 219(5157), pp. 959–.
- Mason, H. S. (1957) 'Mechanisms of oxygen metabolism', *Science*, 19, pp. 79–233.
- \*Matthes, M. S., Best, N. B., Robil, J. M., Malcomber, S., Gallavotti, A. & McSteen, P. (2019) 'Auxin EvoDevo: Conservation and diversification of genes regulating auxin

biosynthesis, transport, and signaling', *Molecular Plant*. Elsevier Ltd, 12(3), pp. 298–320.

\*Meek, L., Martin, R. C., Shan, X., Karplus, P. A., Mok, D. W. S. & Mok, M. C. (2008) 'Isolation of legume glycosyltransferases and active site mapping of the *Phaseolus lunatus* zeatin O-glucosyltransferase ZOG1', *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(2), pp. 192–201.

Mellor, N., Band, L. R., Pěňík, A., Novák, O., Rashed, A., Holman, T., Wilson, M. H., Vo, U., Bishopp, A., King, J. R., Ljung, K., Bennett, M. J. & Owen, M. R. (2016) 'Dynamic regulation of auxin oxidase and conjugating enzymes AtDAO1 and GH3 modulates auxin homeostasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(39), pp. 11022–11027.

Michalczyk, L. & Bandurski, R. S. (1982) 'Enzymic synthesis of 1-O-indol-3-ylacetyl-beta-D-glucose and indol-3-ylacetyl-myoinositol', *The Biochemical journal*, 207(2), pp. 273–281.

Michalczyk, L. & Bandurski, R. S. (1980) 'UDP-glucose: Indoleacetic acid glucosyl transferase and indoleacetyl-glucose: Myo-inositol indoleacetyl transferase', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93(2), pp. 588–592.

Mikkelsen, M. D., Hansen, C. H., Wittstock, U. & Halkier, B. A. (2000) 'Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid', *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), pp. 33712–33717.

Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y. D., Dobrev, P. I., Schwarzerová, K., Rolčík, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benková, E., Zažímalová, E., Geisler, M., Friml, J. (2009) 'Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter', *Nature*, 459(7250), pp. 1136–1140.

Naramoto, S. (2017) 'Polar transport in plants mediated by membrane transporters: Focus on mechanisms of polar auxin transport', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 40, pp. 8–14.

Nonhebel, H. M. (2015) 'Tryptophan-independent indole-3-acetic acid synthesis: Critical evaluation of the evidence', *Plant Physiology*, 169(2), pp. 1001–1005.

Nonhebel, H. M. & Bandurski, R. S. (1984) 'Oxidation of indole-3-acetic acid and oxindole-3-acetic acid to 2,3-dihydro-7-hydroxy-2-oxo-1H Indole-3-acetic acid-7'-O-β-D-glucopyranoside in *Zea mays* seedlings', *Plant Physiology*, 76(4), pp. 979–983.

Nonhebel, H. M., Kruse, L. I. & Bandurski, R. S. (1985) 'Indole-3-acetic acid catabolism in *Zea mays* seedlings. Metabolic conversion of oxindole-3-acetic acid to 7-hydroxy-2-oxindole-3-acetic acid 7'-O-β-D-glucopyranoside', *Journal of Biological Chemistry*, 260(23), pp. 12685–12689.

Normanly, J. (1997) 'Auxin metabolism', *Physiologia Plantarum*, 100(3), pp. 431–442.

Okrent, R. A., Brooks, M. D. & Wildermuth, M. C. (2009) 'Arabidopsis GH3.12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate', *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), pp. 9742–9754.

Olatunji, D., Geelen, D. & Verstraeten, I. (2017) 'Control of endogenous auxin levels in plant root development', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).

- Östin, A., Catala, C., Chamarro, J. & Sandberg, G. (1995) 'Identification of glucopyranosyl- $\beta$ -1,4-glucopyranosyl- $\beta$ -1-N-oxindole-3-acetyl-N-aspartic acid, a new IAA catabolite, by liquid chromatography/tandem mass spectrometry', *Journal of Mass Spectrometry*, 30(7), pp. 1007–1017.
- Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R. P. & Sandberg, G. (1998) 'Metabolism of indole-3-acetic acid in arabidopsis', *Plant Physiology*, 118(1), pp. 285–296.
- Ostrowski, M., Ciarkowska, A., Dalka, A., Wilmowicz, E. & Jakubowska, A. (2020) 'Biosynthesis pathway of indole-3-acetyl-myoinositol during development of maize (*Zea mays* L.) seeds', *Journal of Plant Physiology*. Elsevier, 245.
- Ostrowski, M., Jakubowska, A. & Kononowicz, A. (2014) 'UDP-glycosyltransferases of plant hormones', *Advances in Cell Biology*, 4(1), pp. 43–60.
- Pěňčík, A., Simonovik, B., Petersson, S. V., Henyková, E., Simon, S., Greenham, K., Zhang, Y., Kowalczyk, M., Estelle, M., Zažímalová, E., Novák, O., Sandberg, G. & Ljung, K. (2013) 'Regulation of auxin homeostasis and gradients in Arabidopsis roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid', *Plant Cell*, 25(10), pp. 3858–3870.
- Petrášek, J. & Friml, J. (2009) 'Auxin transport routes in plant development', *Development*, 136(16), pp. 2675–2688.
- Porco, S., Pěňčík, A., Rashed, A., Voß, U., Casanova-Sáez, R., Bishopp, A., Golebiowska, A., Bhosale, R., Swarup, R., Swarup, K., Penáková, P., Novák, O., Staswick, P., Hedden, P., Phillips, A. L., Vissenberg, K., Bennett, M. J. & Ljung, K. (2016) 'Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(39), pp. 11016–11021.
- Ray, P. M. (1956) 'The destruction of indoleacetic acid. II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 64(1), pp. 193–216.
- Reinecke, D. M. (1999) '4-Chloroindole-3-acetic acid and plant growth', *Plant Growth Regulation*, 27(1), pp. 3–13.
- Reinecke, D. M. & Bandurski, R. S. (1983) 'Oxindole-3-acetic acid, an indole-3-acetic acid catabolite in *Zea mays*', *Plant Physiology*, 71(1), pp. 211–213.
- Reinecke, D. M. & Bandurski, R. S. (1987) 'Auxin biosynthesis and metabolism', in Davies, P. J. (ed.) *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Springer, Dodrecht, pp. 24–42.
- Reinecke, D. M., Ozga, J. A. & Magnus, V. (1995) 'Effect of halogen substitution of indole-3-acetic acid on biological activity in pea fruit', *Phytochemistry*, 40(5), pp. 1361–1366.
- Rescher, U., Walther, A., Schiebl, C. & Klämbt, D. (1996) 'In vitro binding affinities of 4-chloro-, 2-methyl-, 4-methyl-, and 4-ethylindoleacetic acid to auxin-binding protein 1 (ABP1) correlate with their growth-stimulating activities', *Journal of Plant Growth Regulation*, 15(1), pp. 1–3.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J. J., Rothenberg, M. & Ecker, J. R. (1995) 'Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: Five novel mutant loci integrated into a stress response pathway', *Genetics*, 139(3), pp. 1393–1409.
- Rubery, P. H. & Sheldrake, A. R. (1973) 'Effect of pH and surface charge on cell uptake of



auxin', *Nature New Biology*, 241(139), pp. 285–288.

Sabater, F., Sánchez-Bravo, J. & Acosta, M. (1983) 'Effects of enzyme/substrate ratio and of cofactors on the oxidation products of indole-3-acetic acid catalyzed by peroxidase.', *Revista Espanola de Fisiologia*, 39(2), pp. 169–173.

\*Salkowski, E. (1885) 'About behavior of skatol-carbonic acid in organism', *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 1885, pp. 23–33.

Sanchez Carranza, A. P., Singh, A., Steinberger, K., Panigrahi, K., Palme, K., Dovzhenko, A. & Dal Bosco, C. (2016) 'Hydrolases of the ILR1-like family of Arabidopsis thaliana modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6, pp. 1–11.

Sauer, M. & Kleine-Vehn, J. (2019) 'PIN-formed and PIN-likes auxin transport facilitators', *Development (Cambridge)*, 146(15).

Sauer, M., Robert, S. & Kleine-Vehn, J. (2013) 'Auxin: Simply complicated', *Journal of Experimental Botany*, 64(9), pp. 2565–2577.

Schneider, E. A. & Wightman, F. (1974) 'Metabolism of auxin in higher plants', *Annual Review of Plant Physiology*, 25(1), pp. 487–513.

Seidel, C., Walz, A., Park, S., Cohen, J. D. & Ludwig-Müller, J. (2006) 'Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis', *Plant Biology*, 8(3), pp. 340–345.

Sembdner, G., Gross, D., Liebisch, H.-W. & Schneider, G. (1980) 'Biosynthesis and metabolism of plant hormones', in MacMillan J. (ed.) *Hormonal Regulation of Development I. Encyclopedia of Plant Physiology*. 9th edn. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 281–444.

Siehr, D. J. (1961) 'The formation of oxindole acetic acid from indoles by a Basidiomycete', *Journal of the American Chemical Society*, 83(10), pp. 2401–2402.

Simon, S. & Petrášek, J. (2011) 'Why plants need more than one type of auxin', *Plant Science*, 180(3), pp. 454–460.

Small, D. K. & Morris, D. A. (1990) 'Promotion of elongation and acid invertase activity in Phaseolus vulgaris L. internode segments by phenylacetic acid', *Plant Growth Regulation*, 9(4), pp. 329–340.

Smolka, A., Welander, M., Olsson, P., Holefors, A. & Zhu, L. H. (2009) 'Involvement of the ARRO-1 gene in adventitious root formation in apple', *Plant Science*, 177(6), pp. 710–715.

Smolko, A., Ludwig-Müller, J. & Salopek-Sondi, B. (2018) 'Auxin amidohydrolases – From structure to function: Revisited', *Croatica Chemica Acta*, 91(2), pp. 233–239.

\*Soeno, K., Fujioka, S., Hiranuma, S., Seto, H. & Yoshida, S. (2006) 'Metabolic conversion of castasterone and brassinolide into their glucosides in higher plants', *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(3), pp. 195–202.

Srivastava, L. M. (2002) 'Auxins', in Srivastava, L. M. (ed.) *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Academic Press, pp. 155–169.

Staswick, P. E. (2009) 'The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors', *Plant Physiology*, 150(3), pp. 1310–1321.

Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C. &

- Suza, W. (2005) 'Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid', *Plant Cell*, 17(2), pp. 616–627.
- Steffens, B. & Lüthen, H. (2000) 'New methods to analyse auxin-induced growth II: The swelling reaction of protoplasts - A model system for the analysis of auxin signal transduction?', *Plant Growth Regulation*, 32(2–3), pp. 115–122.
- \*Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D. Y., Doležal, K., Schlereth, A., Jürgens, G. & Alonso, J. M. (2008) 'TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development', *Cell*, 133(1), pp. 177–191.
- Stepanova, A. N. & Alonso, J. M. (2016) 'Auxin catabolism unplugged: Role of IAA oxidation in auxin homeostasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Academy of Sciences, 113(39), pp. 10742–10744.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y. & Kasahara, H. (2009) 'Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13), pp. 5430–5435.
- Sugawara, S. ... Kasahara, H. (2015) 'Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants', *Plant and Cell Physiology*, 56(8), pp. 1641–1654.
- Swarup, R., Swarup, R., Marchant, A., Marchant, A., Ljung, K., Ljung, K., Sandberg, G., Sandberg, G., Palme, K., Palme, K., Bennett, M. & Bennett, M. (2001) 'Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex', *Genes & Development*, 15(20), pp. 2648–2653.
- Swarup, R. & Bhosale, R. (2019) 'Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants', *Frontiers in Plant Science*, 10, pp. 1–14.
- Szerszen, J. B., Szczyglowski, K. & Bandurski, R. S. (1994) 'iaglu, a gene from Zea mays involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid', *Science*, 265(5179), pp. 1699–1701.
- Tanaka, K., Hayashi, K. I., Natsume, M., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Kawaide, H. & Kasahara, H. (2014) 'UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in Arabidopsis', *Plant and Cell Physiology*, 55(1), pp. 218–228.
- \*Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballaré, C. L., Sandberg, G., Noel, J. P. & Chory, J. (2008) 'Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants', *Cell*, 133(1), pp. 164–176.
- Thimann, K. (1938) 'Hormones and the analysis of growth', *Plant Physiology*, 13(3), pp. 437–449.
- Titapiwatanakun, B. & Murphy, A. S. (2009) 'Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: Cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition', *Journal of Experimental Botany*, 60(4), pp. 1093–1107.
- Tivendale, N. D., Davies, N. W., Molesworth, P. P., Davidson, S. E., Smith, J. A., Lowe, E. K., Reid, J. B. & Ross, J. J. (2010) 'Reassessing the role of N-hydroxytryptamine in auxin biosynthesis', *Plant Physiology*, 154(4), pp. 1957–1965.

- Tsavkelova, E., Oeser, B., Oren-Young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B. & Sharon, A. (2012) 'Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species', *Fungal Genetics and Biology*, 49(1), pp. 48–57.
- Tsurumi, S. & Wada, S. (1980) 'Metabolism of indole-3-acetic acid and natural occurrence of dioxindole-3-acetic acid derivatives in *Vicia* roots', *Plant and Cell Physiology*, 21(8), pp. 1515–1525.
- Vielba, J. M. (2019) 'Identification and initial characterization of a new subgroup in the GH3 gene family in woody plants', *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. Springer India, 28(3), pp. 280–290.
- Voß, U. ... Bennett, M. J. (2015) 'The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*', *Nature Communications*, 6.
- Walz, A., Park, S., Slovin, J. P., Ludwig-Müller, J., Momonoki, Y. S. & Cohen, J. D. (2002) 'A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), pp. 1718–1723.
- \*Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V. & Sah, S. K. (2016) 'Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants', *Crop Journal*, 4(3), pp. 162–176.
- Westfall, C. S., Zubieta, C., Herrmann, J., Kapp, U., Nanao, M. H. & Jez, J. M. (2012) 'Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by gh3 proteins', *Science*, 336(6089), pp. 1708–1711.
- Westfall, C. S., Sherp, A. M., Zubieta, C., Alvarez, S., Schraft, E., Marcellin, R., Ramirez, L. & Jez, J. M. (2016) '*Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), pp. 13917–13922.
- Wightman, F. & Lighty, D. L. (1982) 'Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants', *Physiologia Plantarum*, 55(1), pp. 17–24.
- Woodward, A. W. & Bartel, B. (2005) 'Auxin: Regulation, action, and interaction', *Annals of Botany*, 95(5), pp. 707–735.
- \*Xu, Z. J., Nakajima, M., Suzuki, Y. & Yamaguchi, I. (2002) 'Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings', *Plant Physiology*, 129(3), pp. 1285–1295.
- Yang, C., Wang, D., Zhang, C., Kong, N., Ma, H. & Chen, Q. (2019) 'Comparative analysis of the PIN auxin transporter gene family in different plant species: A focus on structural and expression profiling of PINs in *Solanum tuberosum*', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13).
- Zažímalová, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerová, K. & Hošek, P. (2010) 'Auxin transporters - Why so many?', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), pp. 1–15.
- Zhang, C., Zhang, L., Wang, D., Ma, H., Liu, B., Shi, Z., Ma, X., Chen, Y. & Chen, Q. (2018) 'Evolutionary history of the glycoside hydrolase 3 (GH3) family based on the sequenced genomes of 48 plants and identification of jasmonic acid-related GH3 proteins in *solanum tuberosum*', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), pp. 1–16.

- Zhang, J., Lin, J. E., Harris, C., Pereira, F. C. M., Wu, F., Blakeslee, J. J. & Peer, W. A. (2016) 'DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(39), pp. 11010–11015.
- Zhang, J. & Peer, W. A. (2017) 'Auxin homeostasis: The DAO of catabolism', *Journal of Experimental Botany*, 68(12), pp. 3145–3154.
- Zhang, R., Wang, B., Ouyang, J., Li, J. & Wang, Y. (2008) 'Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis', *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(9), pp. 1070–1077.
- Zhao, Y. (2018) 'Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes', *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), pp. 417–435.
- Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. & Chory, J. (2001) 'A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis', *Science*, 291(5502), pp. 306–309.
- Zhao, Z., Zhang, Y., Liu, X., Zhang, X., Liu, S., Yu, X., Ren, Y., Zheng, X., Zhou, K., Jiang, L., Guo, X., Gai, Y., Wu, C., Zhai, H., Wang, H. & Wan, J. (2013) 'A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 27(1), pp. 113–122.
- Zheng, Z., Guo, Y., Novák, O., Dai, X., Zhao, Y., Ljung, K., Noel, J. P. & Chory, J. (2013) 'Coordination of auxin and ethylene biosynthesis by the aminotransferase VAS1', *Nature Chemical Biology*, 9(4), pp. 244–246.
- Zimmerman, P. W. & Wilcoxon, F. (1935) 'Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants', *Contributions from Boyce Thompson Institute*, 7, pp. 209–229.

\* sekundární citace